

**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS  
OBTENIDOS DE OVARIOS DE MATADERO CON TRES PRESIONES DE  
VACÍO.”**

Tesis previa a la obtención del Título  
de Médico Veterinario Zootechnista.

**Autores:**

Armando Ramiro Mocha Zhispon C.I. 0105505739

Adrian Ignacio Quezada Contreras C.I. 0105017966

**Director:**

Dr. Fernando Perea Ganchou, PhD  
C.I. 0151638103

CUENCA-ECUADOR

2017



## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la calidad y maduración de los ovocitos bovinos aspirados de ovarios de matadero con tres presiones de vacío: 50 mmHg (T1), 65 mmHg (T2), 80 mmHg (T3). Para cada grupo experimental se colectaron 84 ovarios de los cuales se recuperaron alrededor de 626 ovocitos por grupo. Los ovarios fueron transportados en condiciones adecuadas al laboratorio. Los ovarios fueron asignados al azar a cada uno de los tratamientos y se aspiraron folículos entre 2 y 8 mm con una bomba de vacío. Los COCs recuperados se categorizaron y se usaron los A y B. Luego se seleccionaron al azar un 30% de los mismos para realizar pruebas de viabilidad, morfometría y progresión de la meiosis. La media de folículos aspirados por ovario fue de 13.8, 11.4 y 12.0 para T1, T2, y T3 respectivamente. La tasa de recuperación fue estadísticamente similar entre tratamientos. El porcentaje de ovocitos clase A y B fue significativamente mayor en T1 (88,6%) y T2 (85,5%) con respecto a T3 (80,4%;  $P < 0,05$ ), mientras que la viabilidad no varió entre presiones de vacío. Una mayor proporción de ovocitos de T1 (52,5%;  $P < 0,05$ ) completaron la meiosis en relación a T2 (49,4%) y T3 (45,2). Irrespectivamente del vacío utilizado, hubo una reducción significativa de los valores morfométricos luego de que los ovocitos completaron el proceso de maduración. En conclusión, el vacío usado para la obtención de ovocitos bovinos de ovarios de camal afectó algunas características funcionales y las variables morfométricas estudiadas.

Palabras clave: Ovocitos bovinos, presión de vacío, morfometría, tasa de maduración.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the quality and maturation of bovine oocytes aspirated from slaughterhouse ovaries with three vacuum pressures: 50 mmHg (T1), 65 mmHg (T2), 80 mmHg (T3). For each experimental group, 84 ovaries were collected, from which about 626 oocytes were recovered per group. The ovaries were transported in appropriate conditions to Laboratory. Ovaries were randomly assigned to each treatment, and follicles between 2 and 8 mm were aspirated with a vacuum pump. The recovered COCs were then categorized and only A and B were chosen. Then, 30% of them were randomly selected to perform tests of viability and progression of meiosis, and morphometric measurements. The mean number of follicles aspirated per ovary was 13.8, 11.4 and 12.0 for T1, T2, and T3 respectively. The recovery rate was statistically similar between treatments. The percentage of class A and B oocytes was significantly greater in T1 (88.6%) and T2 (85.5%) than in T3 (80.4%,  $P < 0.05$ ), whereas viability did not vary between vacuum pressures. A greater proportion of oocytes from T1 (52.5%,  $P < 0.05$ ) than T2 (49.4%) and T3 (45.2) completed meiosis. Irrespectively of the vacuum used, there was a significant reduction of the morphometric values after the oocytes completed the maturation process. Likewise. In conclusion, the vacuum used to obtain bovine oocytes from slaughterhouse ovaries affected some functional characteristics and the morphometric variables studied.

Key words: Bovine oocytes, vacuum pressure, morphometry, ripening rate.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....	15
1.1 Objetivo general .....	17
1.2 Objetivos Específicos .....	17
1.3 Hipótesis .....	17
2 CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA .....	18
2.1 Reseña histórica .....	18
2.2 Ovogénesis .....	18
2.3 Foliculogénesis .....	19
2.3.1 Folículos primordiales .....	19
2.3.2 Folículos primarios y secundarios .....	19
2.3.3 Folículo terciario o antral .....	20
2.4 Recolección y transporte de ovarios .....	20
2.5 Obtención de los ovocitos .....	21
2.5.1 Obtención de ovocitos post mortem .....	21
2.5.2 Obtención de ovocitos in vivo .....	22
2.6 Factores que afectan la calidad de los ovocitos .....	25
2.6.1 Edad de animal .....	25
2.6.2 Categoría de los animales .....	25
2.6.3 Condición nutricional .....	25
2.6.4 Factores medioambientales .....	26
2.6.5 Técnicas de recuperación de los ovocitos .....	26



2.6.6	Tamaño de los ovarios .....	26
2.7	Evaluación de la calidad del ovocito .....	27
2.8	Diámetro del ovocito.....	27
2.9	Viabilidad de los ovocitos .....	28
2.10	Actividad Mitocondrial .....	28
2.11	Maduración de los ovocitos.....	29
2.11.1	Medios de maduración cultivo .....	30
2.11.2	Condición medio ambiental para la maduración de ovocitos in vitro 31	
2.11.3	Fisiología de la maduración.....	31
3	CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
3.1	Materiales:.....	32
3.1.1	Recursos materiales disponibles .....	32
3.1.2	Materiales Físicos.....	32
3.1.3	Biológicos .....	33
3.1.4	Químicos .....	33
3.1.5	Materiales de laboratorio .....	33
3.1.6	Materiales de oficina.....	34
3.2	Método .....	34
3.2.1	El área de estudio.....	34
3.2.2	Unidad de análisis .....	35
3.2.3	Metodología.....	35



3.2.4	Diseño experimental y análisis estadístico .....	39
4	CAPITULO IV: RESULTADOS.....	41
5	CAPITULO V: DISCUSIÓN .....	47
5.1	Tasa de recuperación de ovocitos .....	47
5.2	Calidad y viabilidad de los ovocitos.....	48
5.3	Maduración de ovocitos (progresión de la meiosis) .....	50
5.4	Características morfológicas.....	51
6	CAPITULO VI: CONCLUSIONES .....	53
7	CAPITULO VII: RECOMENDACIONES.....	54
8	CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	55
9	ANEXOS .....	64



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efecto de la presión de aspiración folicular con una bomba de vacío sobre la tasa de recuperación, calidad, viabilidad y tasa de maduración de ovocitos bovinos (media $\pm$ error estándar) .....	42
<b>Tabla 2.</b> Efecto de la maduración in vitro sobre las características morfométricas de ovocitos bovinos aspirados de ovarios de matadero mediante una bomba de vacío (media $\pm$ error estándar) .....	43
<b>Tabla 3.</b> Efecto de la presión de aspiración folicular con una bomba de vacío sobre las características morfométricas de ovocitos bovinos antes de la maduración in vitro (media $\pm$ error estándar).....	44
<b>Tabla 4.</b> Efecto de la presión de aspiración con una bomba de vacío sobre las características morfométricas de ovocitos bovinos después de la maduración in vitro (media $\pm$ error estándar). .....	45
<b>Tabla 5.</b> Efecto de la presión de aspiración de folículos bovinos con una bomba de vacío sobre algunos parámetros morfométricos de ovocitos bovinos antes y después de la maduración in vitro (media $\pm$ error estándar). .....	46



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

<b>T1</b>	Tratamiento 1
<b>T2</b>	Tratamiento 2
<b>T3</b>	Tratamiento 3
<b>COCs</b>	Complejo cumulo-ovocitos
<b>SAS</b>	Statistical Analysis Systems
<b>OPU</b>	Ovum Pick-Up
<b>FIV</b>	Fertilización in vitro
<b>PIV</b>	Producción in vitro de embriones
<b>PBS</b>	Suero fetal bovino
<b>mmHg</b>	Milímetros de mercurio
<b>GAGS</b>	Glicosaminoglicanos
<b>MIV</b>	Maduración in vitro
<b>EMURPLAG</b>	Empresa municipal de rastro y plaza de ganado
<b>H-SOF</b>	Hepes-fluido Oviductual sintético
<b>GV</b>	Vesícula germinal
<b>GVBD</b>	Ruptura de vesícula germinal
<b>MI</b>	Metafase I
<b>MII</b>	Metafase II
<b>An-Tel I</b>	Anafase-Telofase I
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>BCB</b>	Azul brillante de cresilo
<b>FSH</b>	Hormona folículo estimulante
<b>ATP</b>	Adenosin tri fosfato
<b>MHz</b>	Mega Herz





Universidad de Cuenca

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

#### CLAUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACION

Armando Ramiro Mocha Zhispon en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS DE OVARIOS DE MATADERO CON TRES PRESIONES DE VACÍO"**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de octubre del 2017

Armando Ramiro Mocha Zhispon

C.I: 0105505739



Universidad de Cuenca  
Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

#### CLAUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACION

Adrian Ignacio Quezada Contreras en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS DE OVARIOS DE MATADERO CON TRES PRESIONES DE VACÍO"**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de octubre del 2017

Adrian Ignacio Quezada Contreras

C.I: 0105017966



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Armando Ramiro Mocha Zhispon, autor del trabajo de titulación **“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS DE OVARIOS DE MATADERO CON TRES PRESIONES DE VACÍO”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 16 de octubre del 2017

---

Armando Ramiro Mocha Zhispon

C.I: 0105505739



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Adrian Ignacio Quezada Contreras, autor del trabajo de titulación **"EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS DE OVARIOS DE MATADERO CON TRES PRESIONES DE VACÍO"**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 16 de octubre del 2017

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Adrian Ignacio Quezada Contreras", written over a horizontal line.

Adrian Ignacio Quezada Contreras

C.I: 0105017966



## **AGRADECIMIENTOS**

Le damos gracias a DIOS por brindarnos la vida y la persistencia para poder terminar nuestros estudios universitarios, a pesar de los obstáculos que se nos presentaron, ya que sin él sería imposible lograrlo.

A nuestros padres, familiares y amigos por estar pendientes y apoyarnos incondicionalmente a lo largo de nuestras vidas y sobre todo para alcanzar este objetivo.

También agradecemos infinitamente a nuestro director Dr. Fernando Perea Ganchou, PhD y también al Dr. Daniel Argudo, quienes nos apoyaron y estuvieron presentes en cada una de las etapas de nuestro proyecto hasta su culminación.

Al laboratorio de Biotecnología de la reproducción de la Facultad de Ciencias agropecuarias de la Universidad de Cuenca por la colaboración para la ejecución del trabajo de tesis.

Además, queremos agradecer al Dr. Darío Sari y al personal que labora en el Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG) por su colaboración para la obtención de los ovarios.



## DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a Dios por haber sido un pilar esencial para lograr mi objetivo dándome salud, sabiduría y protección, y a mi amiga y esposa Maribel S.

De la misma forma a mis madres (María Z., María M.) y también a mis muy apreciados y queridos hermanos y familiares (José Z, Julia, Ana, Sergio, Silvia, Alejita, José S., Zoila P., Mayra y Alexander) que siempre estuvieron cuando más los necesitaba y fueron un apoyo incondicional

**Los quiero mucho**

**Armando Mocha Z.**

En primer lugar, quiero dedicar este trabajo a Dios ya que soy de esas personas que piensa que sin el favor de él no se logra nada y creo fielmente que me acompañó durante toda mi vida, y de forma muy especial se lo quiero dedicar a mi esposa Nancy, que siempre me ha apoyado y brindado su amor.

Ahora, también se lo quiero dedicar a la personita que desde que llego a mi vida me ha llenado de alegría, ella es mi pequeña hija Daniela que es el motor que me impulsa a ser mejor día a día.

De igual forma a mi familia y de manera muy especial a mi mamá (María) a la cual le doy gracias por saber llevarme hasta donde estoy, me siento muy orgulloso de ti mami te amo, a mi papá (Marcelino) por guiarme y apoyarme en este camino, mis hermanas menores (María Paz y Yajaira), mis hermanos menores (José y Marcelo) y a todas las personas que de una u otra manera me han apoyado en este camino.

**Los amo**

**Adrian Quezada C.**



## 1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

Hoy en día la producción in vitro de embriones (PIV) se ha convertido en una biotécnica reproductiva muy importante que está en pleno auge en nuestro país. Sin embargo, como en otras biotecnologías reproductivas, muchos aspectos y métodos aplicados durante la misma están en continua experimentación debido a la baja eficiencia que se ha logrado hasta el momento (Benavides,2012). Existen varios métodos para la obtención de ovocitos bovinos necesarios para el proceso de producción in vitro de embriones (PIV), ya sean estos provenientes de animales vivos o de ovarios de matadero, si se trata de animales vivos el método más común de recuperación de ovocitos es por medio de la aspiración folicular guiada por ultrasonografía mundialmente conocido como ovum pick-up (OPU), mientras que para ovarios de matadero los ovocitos se los puede obtener por medio de aspiración folicular con una jeringa, seccionamiento ovárico, método de la llave de agua y con la bomba de vacío utilizada en OPU (Sendaga *et al.*,2008; Seneda *et al.*,2004).

Lo que se busca con cualquier método de recolección de ovocitos, es obtener el mayor número de ovocitos viables para los procesos de maduración y fecundación in vitro, es decir un mayor número de ovocitos tipo I y II según la clasificación de (De Loos y Col, 1989). Existen deferentes factores que afectan la calidad de los ovocitos al momento de su recuperación mediante la técnica de OPU (tipo y calibre de aguja, frecuencia, raza, condición corporal, etc.) Entre ellos, la presión de vacío utilizada para la recuperación de ovocitos ha sido documentada (Hasler, 1998; Ward y Col., 2000; Gordon, 2003; Boni, 2012).

Las evidencias indican que la presión de vacío durante la aspiración de ovocitos mediante OPU afecta el número y características de los ovocitos recuperados, así como también su competencia para madurar y desarrollarse a blastocistos luego de la FIV (Hasler, 1998; Vos y Col., 1999; Ward y Col., 2000).

La presión de vacío también comprometió la competencia de los ovocitos para madurar, desarrollarse a blastocistos y de eclosionar (Vos y Col., 1999; Ward y



col. 2000). Ward y col. (2000) evaluaron el efecto de cuatro presiones de vacío (30, 50, 70, 90 mmHg) sobre la competencia de los ovocitos de progresar a blastocistos luego de la FIV. Aunque la presión aplicada durante la OPU no afectó el número de ovocitos recuperados, como si lo indicaron otros estudios (Hesler, 1998; Vos y col., 1999), los ovocitos aspirados con una presión de 90 mmHg comprometieron su viabilidad y redujeron en más de 20% lograr iniciar la segmentación luego de la FIV. Aun mas, las presiones de vacío superiores a 50 mmHg redujeron en promedio 2.8 y 4.5 veces la capacidad de los embriones para progresar a los estadios de blastocistos y blastocistos protruidos respectivamente (Ward y Col., 2000).

El desarrollo de este trabajo de investigación pretende contribuir a validar un método para obtener el mayor número de ovocitos viables, tanto recuperados de matadero como en animales vivos, para los programas de producción in vitro de embriones (PIV) en la región. En tal sentido, se ha demostrado que existe una relación entre la calidad y la maduración ovocitaria, ya que los ovocitos de calidad superior, es decir los de tipo A tienen mayor tasa de maduración que los de calidad inferior (Cañon et al., 2011).

De manera que, usando como modelo experimental la aspiración de ovocitos bovinos obtenidos en el Camal Municipal del Cantón Cuenca, mediante la bomba de vacío de un equipo de OPU pudiera determinarse cuál es la presión de aspiración más adecuada en las condiciones geográficas y ambientales en la región de la Sierra sur del Ecuador. La información obtenida podría ser utilizada como referencia para la obtención del mayor número de ovocitos de buena calidad de animales vivos mediante OPU, que garantice una adecuada producción de embriones para la mejora genética del ganado bovino de la región.





### 1.1 Objetivo general

Evaluar la calidad y maduración de los ovocitos bovinos colectados de ovarios de matadero con tres presiones de aspiración folicular.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Determinar la recuperación de ovocitos obtenidos de ovarios de matadero.
- Establecer la morfometría y viabilidad de los ovocitos inmaduros recuperados.
- Analizar el progreso de la meiosis de los ovocitos luego de la maduración in vitro.
- Instaurar la relación entre la morfometría de los ovocitos madurados in vitro y la progresión de la meiosis.

### 1.3 Hipótesis

La presión de vacío durante la aspiración folicular de ovarios bovinos de matadero influye sobre la calidad y maduración de los ovocitos.



## 2 CAPITULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Reseña histórica

Son varios años ya que los genetistas e investigadores vienen trabajando para mejorar genéticamente los hatos bovinos en todo el mundo, seleccionando animales genéticamente superiores en cuanto a producción se refiere. Para ello, a lo largo de todos estos años, el desarrollado y perfeccionamiento de una serie de biotecnologías reproductivas que se han convertido en herramientas fundamentales para este fin (Barba, 2016).

En un inicio la técnica de ovum pick up se utilizó para la reproducción asistida en humanos, pero con el pasar de los años se pudo emplear para trabajar con animales, utilizándose por primera vez en bovinos a finales de la década de los 80 en Holanda. En el año de 1994 comenzó a aplicarse de manera rutinaria en la reproducción asistida veterinaria (Alvarado, 2017). En esta última década, OPU se ha convertido en el mejor método de recuperación de ovocitos bovinos in vivo, permitiendo obtener ovocitos en forma repetida en animales de alto valor genético de una manera menos cruenta, ya que antes de la aparición de la ultrasonografía, se venían utilizando métodos como la laparoscopia transvaginal y la laparotomía paralumbar para la recuperación in vivo de estas gametas, pero cayeron en desuso por sus múltiples desventajas (Ongaratto, 2013).

### 2.2 Ovogénesis

Se comprende por ovogénesis al proceso de formación y desarrollo de la célula sexual de la hembra, el ovocito. El proceso se inicia en la vida fetal de la hembra, durante el desarrollo embrionario a partir de las células germinales primordiales que se diferencian del epitelio del saco vitelino, y migran a través del mesenterio para colonizar las gónadas primitivas del mesonefro, en donde se diferencian en ovogonias (Hyttel et al., 2010; Hyttel P.; Sinowatz F.; Vejlsted M. 2011). Las ovogonias que se dividen por mitosis, siendo el número de divisiones mitóticas específica de cada especie, finalmente se diferencian en ovocitos primarios previo inicio de la primera división meiótica (Gigli, 2006).



Una vez se inicia la meiosis I, los ovocitos se rodean de células foliculares (células pregranulosas) y el proceso se detiene en estado de diploteno de la profase I, ovocito I, conocido como estado dictiático. La meiosis se reinicia luego la pubertad, después de ocurrir el pico ovulatorio de LH, en cuyo caso el ovocito contenido en el folículo preovulatorio culmina la meiosis I y avanza hasta la metafase II, que es el estadio en que se encuentra el ovocito II al momento de la ovulación y durante el periodo posterior previo a la fecundación. Luego que el espermatozoide fecundante penetra en el ovocito se reanuda y culmina la meiosis II, con la formación de un ovocito maduro y el segundo corpúsculo polar, que pueda observarse junto al primero en el espacio perivitelino (Palma, 2001).

### **2.3 Folículogénesis**

Es un proceso de crecimiento y diferenciación aparentemente continuo e irreversible de los folículos primordiales (Fernández, 2003) a través de varios estadios (primario, secundario y antral) que conducen al desarrollo de un folículo preovulatorio o De Graff (Palma, 2001). Todos los folículos primordiales que entran al proceso de crecimiento tienen dos destinos: la atresia o la ovulación. Se estima que el periodo de tiempo transcurrido desde la activación de un folículo primordial durmiente hasta la ovulación es de 180 días (Fernández, 2003).

#### **2.3.1 Folículos primordiales**

Se denominan así a todos los folículos que contienen un ovocito rodeado por una capa de células foliculares planas (células pregranulosas), que mediante un mecanismo intraovárico no dependiente de gonadotrofinas se activan y salen del estado de aquiescencia uniéndose al pool de folículos en crecimiento (Wandji et al., 1996a, 1996b, 1997).

#### **2.3.2 Folículos primarios y secundarios**

Cuando la capa simple de células planas que se encuentra rodeando al ovocito sufre una transformación y pasa de células planas a cuboides y la teca interna ha comenzado su diferenciación, el folículo en desarrollo se denomina folículo



primario (Fernández, 2003). El siguiente estado de crecimiento del folículo se denomina folículo secundario y se caracteriza por la proliferación de las células de la granulosa en dos o más capas que rodean al ovocito, describiéndose ambos estados de desarrollo folicular como preantrales.

### **2.3.3 Folículo terciario o antral**

Se caracterizan porque las células de la granulosa empiezan a secretar líquido que causa la formación de una cavidad entre ellas; esta cavidad se la denomina antro folicular y va aumentando de tamaño en la medida que mayor volumen de líquido folicular se acumula en el mismo. Este se denomina líquido folicular, y a partir de la aparición del antro folicular a estos folículos se les denomina folículos terciarios (Palma, 2001). Los folículos terciarios que han alcanzado su madurez y se encuentran listos para ovular se denominan folículos preovulatorios o De Graaf.

## **2.4 Recolección y transporte de ovarios**

Sin duda, la forma más económica y fácil de obtener ovocitos es a través de ovarios de matadero; no obstante, se deben prestar especial atención a varios factores que pueden afectar su viabilidad. Entre estos tenemos la temperatura, que debe ser mayor a 30°C ya que temperaturas menores durante el almacenamiento de los ovarios causan problemas en la transcripción y lesionan los orgánulos citoplasmáticos, afectando los índices de maduración de los ovocitos (Matínez, 2013; Gardón, 1999).

Otro factor importante a tomar en cuenta es el tiempo que transcurre desde el almacenamiento de los ovarios durante la recolección, traslado al laboratorio y la obtención de los ovocitos. Se ha estimado que este tiempo debe estar comprendido entre 2 y 7 horas, teniendo este periodo efectos positivos en la maduración in vitro de los ovocitos; pero el tiempo óptimo para obtener los mejores índices de maduración in vitro se estableció en 4 h (Gardón, 1999).

El transporte de los ovarios al laboratorio se realiza en un termo que puede contener una solución salina al 0.9% o PBS a una temperatura que debe oscilar



entre 30 y 38 °C, sin que afecte la calidad de los ovocitos (Peláez, 2011). Generalmente estas soluciones pueden contener antibióticos tales como kanamicina (25 mg/l), penicilina (100 ui/l) o gentamicina (100 ug/l) (Gardón, 1999).

## **2.5 Obtención de los ovocitos**

Hoy en día existen diferentes métodos mediante los cuales se puede obtener ovocitos tanto de animales vivos como de ovarios de matadero para el proceso de producción in vitro de embriones bovinos (Lorenzo, 1992).

### **2.5.1 Obtención de ovocitos post mortem**

Está claro que la forma más sencilla y económica de obtener ovocitos es a través de ovarios de vacas sacrificadas en el matadero, de los cuales se aspiran los folículos con un diámetro que oscile entre 3 y 6 mm. Así, dependiendo del momento del ciclo ovárico en que se encontraban, de cada vaca se pueden recolectar entre 8 y 15 ovocitos, de los cuales entre un 50 y 60% pueden tener la calidad suficiente para madurar, ser fecundados, clivar y avanzar al estadio de blastocisto (Peláez, 2011). Una vez en el laboratorio, los ovarios deben ser lavados varias veces con la misma solución del medio de transporte descrita anteriormente, pudiéndose proceder inmediatamente a recolectar los ovocitos o mantener los ovarios en un baño termostático a 30 °C (Gardón, 1999).

Existen técnicas descritas para la obtención de los ovocitos de ovarios de camal, entre las que podemos citar las siguientes:

#### **2.5.1.1 Aspiración folicular**

Este método consiste en la aspiración de los folículos que se encuentran en la superficie ovárica y que tienen un diámetro mayor a 2 mm (Gardón, 1999), aunque se ha indicado que se deben aspirar aquellos folículos que se encuentran entre 3 y 6 mm de diámetro (Peláez, 2011).

La aspiración se realiza con una aguja con un calibre entre 18 y 21 G conectada a una jeringa de 10 ml. El calibre de la aguja empleada, tiene mucha importancia para preservar la integridad de los ovocitos. En un estudio donde compararon



diferentes diámetros de agujas frente a la calidad de los ovocitos, se determinó que aunque con las agujas de calibre 18 G se obtuvo mayor número de ovocitos, con las agujas de menor calibre se recuperaron más ovocitos de buena calidad (Bols et al., 1996).

La técnica consiste en cargar 1-2 ml de PBS en la jeringa conectada a la aguja, y luego proceder a succionar los folículos de la superficie ovárica que se encuentren entre los diámetros recomendados. Para realizar esta operación se ingresa por el estroma del ovario adyacente al folículo y este no se punciona directamente para evitar comprometer la integridad del mismo. Una vez obtenido el líquido folicular, se coloca en un tubo de precipitación dejándolo decantar por 10 a 20 minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante y aspirar y coloca el pellet en una caja Petri con PBS, con el fin de hacer la búsqueda y selección de los ovocitos aptos para continuar con la fase de maduración, bajo una lupa estereoscópica (Peláez, 2011; Gardón, 1999).

#### **2.5.1.2 Seccionamiento ovárico**

A este método se lo conoce también con el nombre en inglés “slicing”, que básicamente consiste en hacer varios cortes longitudinales y transversales en la superficie ovárica, con el fin de seccionar los folículos localizados en la corteza ovárica y obtener los COCs que son recogidos en un vaso precipitado luego lavar el ovario (Sierra, 2015).

#### **2.5.2 Obtención de ovocitos in vivo**

Los ovocitos se obtienen de animales vivos, ya sean hembras jóvenes, vacas en producción o de descarte. Permite entre otras cosas acortar el intervalo generacional de animales genéticamente superiores, produciendo un número elevado al año de embriones viables y terneros por cada donadora, incrementando además la eficiencia productiva de los hatos ganaderos (Zárate, 2006).



### **2.5.2.1 Técnica de aspiración folicular guiada por ultrasonografía (Ovum pick-up; OPU).**

Es una técnica muy difundida a nivel mundial hoy en día, que ha permitido la recuperación repetida de ovocitos en vaquillas mayores a 6 meses de edad, en animales gestantes durante los tres primeros meses de gestación y también en vacas en producción, 2-3 semanas postparto, sin interferir con el ciclo productivo ni con el desempeño reproductivo de ellas. Por otro lado, esta técnica se puede aplicar al mismo animal durante 5-6 meses seguidos, con una frecuencia de aspiración de dos veces por semana, sin tener efectos nocivos sobre la actividad reproductiva ni el bienestar animal (Peláez, 2011).

Para llevar a cabo este procedimiento primero es necesario sedar levemente al animal con Xilacina i.m. al 2%, o también también con detomidina (0,016 mg/kg de peso vivo IV). Luego de esto, se debe aplicar anestesia epidural con el propósito de disminuir las contracciones abdominales y facilitar la manipulación de los ovarios y la operación de aspiración folicular. Una vez realizado esto, se procede a vaciar el recto teniendo cuidado de no permitir que ingrese aire al mismo, e inmediatamente a limpiar la zona perineal.

La realización del OPU se basa en la utilización de un ecógrafo con un transductor de 5 ó 7.5 MHz, al cual se le acopla una aguja conectada a una bomba de vacío. El transductor se introduce por la vagina hasta el fondo de la misma, y luego por medio de manipulación rectal de los ovarios estos se retraen cerca del transductor, se visualizan los folículos y se aspiran los tengan un diámetro mayor a 2mm a través de la pared vaginal, depositándose el líquido folicular en tubos que contienen medio de mantenimiento (Sierra, 2015).

#### **2.5.2.1.1 Ventajas**

La técnica de OPU presenta varias ventajas con respecto a otros métodos de recuperación de ovocitos en animales vivos, entre estas podemos citar las siguientes:



- Es un método no invasivo y que se puede repetir en el mismo animal varias veces sin comprometer de ninguna forma la vida productiva y reproductiva de la donante.
- Permite obtener ovocitos de calidad de animales genética y productivamente superiores previamente seleccionados, que de una manera segura aumenta el número de descendientes sin la necesidad de sacrificarlos.
- Se la puede utilizar en animales con problemas reproductivos (metritis persistentes, oviductos obstruidos), además en animales viejos que no responden a tratamientos superovulatorios, etc.
- A través de esta técnica se puede obtener ovocitos de vaquillas a partir de los 6 meses de edad, así como también se puede recuperar ovocitos de vacas o vaquillas gestantes hasta los tres primeros meses de edad (Puerta, 2006).

#### **2.5.2.1.2 Desventajas**

- Siempre va a estar dentro de las limitaciones de esta técnica el factor económico, debido a los altos costos que representa obtener el equipo de OPU.
- Disponer de personal capacitado y con experiencia para aplicar la técnica ya que no puede ser realizada por cualquier persona (Puerta, 2006).

#### **2.5.2.2 Recolección de ovocitos por medio de laparoscopia**

Anteriormente se empleaba la laparoscopia como técnica para la recuperación de ovocitos, que tenía como ventaja el bajo costo del equipo en comparación con el de OPU que es mucho más costoso. En la actualidad esta técnica ha caído en desuso debido a varias desventajas, por ejemplo, que no se puede visualizar el corte de pequeños folículos en crecimiento por debajo de la superficie del ovario, por otra parte, se conoce de efectos adversos relacionados con el bienestar





animal, como la formación de adherencias en el lugar de la cirugía, además de ser una técnica muy invasiva (Zárate, 2006).

## **2.6 Factores que afectan la calidad de los ovocitos**

Sin lugar a duda existen muchos factores que afectan la calidad y cantidad de los ovocitos que pueden ser obtenidos en un animal; estas afecciones pueden comprometer la competencia funcional de los ovocitos así como también alterar sus características morfogénicas, todo lo cual puede evidenciarse en la capacidad de estos para madurar, ser fecundados, clivar y alcanzar el estadio de blastocisto (Alvarado, 2017).

### **2.6.1 Edad de animal**

Los ovarios de vacas adultas generan menos ovocitos que las que proporcionan las novillas (INIA, 2007). Sin embargo, según Mermillod et al. (2008) los ovocitos de las hembras pre-púberes son menos aptos que los que se obtiene de vacas adultas. Se pueden obtener ovocitos tanto de animales jóvenes como de animales viejos, pero estos no se desenvuelven de forma igual al momento de los procesos biotecnológicos (Alvarado 2017). El número aproximado de folículos preantrales para una vaquilla es de 109 000 y para una vaca es de 89 000, sin embargo, este número disminuye con el paso de los años (Quispe et al., 2015).

### **2.6.2 Categoría de los animales**

La variabilidad que existe entre animales de carne y leche es obviamente notoria, la diferencia que existe entre las razas influye en la recuperación de los ovocitos, las hembras de raza Bos indicus genera un número mayor de ondas foliculares e igualmente la población folicular es mayor que las de raza Bos taurus (Quispe et al., 2015).

### **2.6.3 Condición nutricional**

La importancia de la nutrición sobre la calidad de los ovocitos es un tema que actualmente no se ha explotado totalmente y la información es limitada (Becaluba, 2007). La nutrición afecta contundentemente la reproducción de las vacas, un



exceso o deficiencia de nutrientes, el bajo consumo de materia seca, la alimentación inadecuada en el periodo de transición puede afectar seriamente a los ovocitos (Campabadal, 2009), así como también las dietas altas en amoníaco interfiere en la disponibilidad de ovocitos competentes (Alvarado, 2017).

#### **2.6.4 Factores medioambientales**

La zona termoneutral para los bovinos va de 0 a 16°C, y se produce estrés calórico cuando la temperatura supera los 23.6°C, lo cual reduce la intensidad y duración del estro de 20 horas a 11.9 horas, afecta la duración del ciclo estral (Gallegos, 1998), así como también la capacidad de los ovocitos para madurar, ser fecundados, y desarrollarse al estado de blastocisto (Paula-Lopes et al., 2012).

#### **2.6.5 Técnicas de recuperación de los ovocitos**

El porcentaje de recuperación de ovocitos de ovarios recolectados del camal es de 50 a 60% con la bomba de vacío de OPU siendo una técnica muy usada; sin embargo, la presión que se use determinara el daño que sufra las células del cúmulo (Alvarado, 2017).

Existe pocas diferencias entre la recuperación de ovocitos post mortem o in vivo, por un lado resulta con un grado mayor de complejidad la manipulación transrectal del ovario frente a la observación completa y detallada que puede realizar el operario en los ovarios recolectados de vacas faenadas (Palma, 2001).

La técnica OPU puede ser usada en vacas en distintos estados fisiológicos, existen factores técnicos como la aguja, la experiencia del operador que pueden influenciar negativamente en la recuperación de los ovocitos, sin embargo, es un método recomendado cuando se desea conservar el animal donante (Ruiz, 2006).

#### **2.6.6 Tamaño de los ovarios**

Alvarado (2017) indicó que el número de ovocitos está estrechamente relacionado con el tamaño y peso del ovario, por lo tanto, en vacas adultas el número de ovocitos que se puede recuperar es mayor que en hembras jóvenes.

## 2.7 Evaluación de la calidad del ovocito

### Clasificación morfológica

(Zarate, 2006) indica que la elección correcta de ovocitos de buena calidad puede ser la diferencia entre el éxito o el fracaso de la producción in vitro de embriones. (Sierra, 2015) aclara que debemos elegir ovocitos tipo A y B que son los adecuados para someterse a la maduración.

(Zarate, 2006) y (Sierra, 2015) indican que los ovocitos pueden clasificarse de acuerdo a las características de las células del cúmulo y del citoplasma en:

Tipo/Categoría	Características
A	Dentro de este grupo se encuentran los ovocitos con varias capas de células del cúmulo en un número mayor a 4 capas y compacta, citoplasma transparente y homogéneo.
B	Ovocitos con 1-3 capas de células del cúmulo, citoplasma homogéneo con algunas zonas oscuras.
C	Ovocitos total o parcialmente desnudos con un citoplasma irregular con zonas oscuras.
D	Los ovocitos poseen un cúmulo con las células expandidas y citoplasma irregular con zonas oscuras.

## 2.8 Diámetro del ovocito

Los ovocitos al adquirir diámetros superiores a 110  $\mu\text{m}$  alcanzan la capacidad para completar la meiosis, los cuales corresponde a los folículos con 2-3 mm (Segura et al., 2015).

La selección de los ovocitos se realiza generalmente en base a tres criterios: el diámetro del ovocito, el aspecto de su citoplasma y las características del cúmulo que los rodea. El diámetro de los ovocitos condiciona su capacidad para madurar, de tal forma, que los ovocitos bovinos con un diámetro inferior a 110  $\mu\text{m}$  se encuentran todavía en fase de crecimiento y no han adquirido aun la capacidad para completar la meiosis I (Hyttel et al., 1997).



La tasa de maduración nuclear aumenta con el diámetro del ovocito, lo que sugiere que los ovocitos con diámetro inferior a 110  $\mu\text{m}$  están aún efectuando la síntesis de ARN, y por consiguiente, todavía se encuentran en fase de crecimiento, es decir, no han completado la maduración nuclear y citoplasmática. No obstante, cuando el diámetro ovocitario supera los 110  $\mu\text{m}$  la mayoría de los ovocitos se desarrollan hasta MII (Rivera, 2013).

Los ovocitos pequeños tienden a seguir un patrón anormal de maduración meiótica dando como resultado disturbios en los procesos de maduración. (Alvarado, 2017 & Martínez, 2013).

## **2.9 Viabilidad de los ovocitos**

Según (Baez et al., 2009) la viabilidad de los ovocitos se lo puede determinar a través de un examen visual que debe enfocarse en la integridad de las membranas ovocitarias, zona pelúcida y normalidad del citoplasma sin embargo (Filipiak & Larocca, 2012) indica que una de las técnicas usadas para establecer la viabilidad de los ovocitos es la tinción supravital del Azul de Tripán, es importante hacer uso de este tipo de técnica para confirmar lo que se aprecia visualmente.

## **2.10 Actividad Mitocondrial**

(Catalá, 2009) indica que la técnica capaz de determinar que los ovocitos han terminado su crecimiento y tienen la capacidad de llegar al estadio de blastocito es el test de Azul Brillante de Cresilo (BCB). Las mitocondrias son capaces de producir ATP en grandes cantidades, y se necesita una adecuada distribución de ellas para completar funciones específicas de las células. Así, la actividad mitocondrial es un indicativo de la energía necesaria para la maduración, fecundación y desarrollo embrionario; de manera que la actividad mitocondrial resulta un factor clave para determinar la maduración citoplasmática y por ende la competencia ovocitaria.



El BCB es una tinción vital que permite evaluar la actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, que es sintetizada durante el crecimiento ovocitario, pero que no está activa una vez que el ovocito finaliza la fase de crecimiento. En este último caso, el citoplasma se torna azul debido a que no hay actividad enzimática que reduzca, y haga incoloro, el citoplasma del ovocito (Pujol et al., 2004).

## **2.11 Maduración de los ovocitos**

La capacidad de un ovocito maduro para superar las etapas de fecundación, el desarrollo del embrión preimplantacional y la implantación es denominada capacidad de desarrollo del ovocito y es una medida intrínseca de la calidad del mismo. Los ovocitos madurados in vitro poseen baja competencia de desarrollo comparados con los ovocitos madurados in vivo, en parte debido al inadecuado ambiente in vitro que soporta el desarrollo completo de la maduración (Landínez et al., 2010).

Durante el proceso de maduración de los ovocitos, tanto in vivo como in vitro, ocurren una serie de cambios que permiten la reanudación de la meiosis. Estos eventos ocurren luego de la descarga ovulatoria de LH, pero antes de la fecundación y se caracterizan por la expansión de las células del cúmulo, la eliminación del primer corpúsculo polar y progresión de la meiosis a metafase II (Gardón, 2009).

In vivo, el ovocito sufre cambios bioquímicos y metabólicos desde el estadio de profase I hasta el de ovocito maduro para la fecundación. Las gonadotrofinas participan activamente en el desarrollo y maduración de los ovocitos. Basado en ese principio, el empleo de gonadotrofinas bovinas u de otras especies se ha generalizado en los suplementos de medios de maduración (Palma, 2001).

Las células del cúmulo también desempeñan un papel importante en la maduración de los ovocitos. Estas células aportan nutrientes y energía (piruvato) al ovocito. También secretan ácido hialurónico a la matriz externa de proteoglicanos, que provoca la ruptura de la matriz y causa la expansión del



cúmulo, que es estimulado por la acción de la FSH, y se caracteriza por el cambio de interacción entre las células del cúmulo y el ovocito (Gardón, 2009).

Los glicosaminoglicanos (GAGS) encontrados en el fluido folicular también son responsables de la expansión del cúmulo. El condroitin sulfato producido por las células de la granulosa en la fase folicular temprana, inhibe la expansión de las células del cúmulo. Posteriormente, estas células secretan ácido hialurónico que permite degradar las uniones intercelulares de las células del cúmulo, y por lo tanto experimentar su expansión (Gardón, 2009).

### **2.11.1 Medios de maduración cultivo**

Para la maduración in vitro (MIV) de los ovocitos se utilizan diferentes medios de cultivo tales como Ham's F-10 y Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1. Todos ellos presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato de sodio, hipoxantina, timidina, y rojo fenol como indicador. En dichos medios, los componentes varían en diferentes proporciones. A pesar de la amplia variedad de medios descrita, el más utilizado es el TCM- 199 (Gardón, 2009).

Estos medios son formulaciones complejas de aminoácidos, sales orgánicas e inorgánicas, vitaminas, nucleótidos etc., y se utilizan en mayor o menor medida, para los procesos de maduración, fecundación y cultivo in vitro por diversos equipos. Los mejores resultados en la maduración in vitro se obtienen con la utilización de los medios M-199, TALP, HAM F-10 y RAM F-12. La importancia del medio de cultivo para la maduración in vitro de los ovocitos es tal que, según algunos autores, condiciona el éxito de los sistemas de fecundación y el posterior desarrollo in vitro de los embriones (Gonzalez, 1992).

En un estudio realizado se muestra que el porcentaje de ovocitos madurados en función de los COC sometidos a este proceso, no mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los dos tratamientos, observando una tasa de MIV de 73.3 vs 71.4 % en el medio HECM-9 y TCM-199, respectivamente (Robledo et al., 2009).



### **2.11.2 Condición medio ambiental para la maduración de ovocitos in vitro**

Cuando los ovocitos son aspirados desde los folículos terciarios reanudan espontáneamente la meiosis y al ser cultivados in vitro continúan con el proceso de maduración. De este modo la composición de los medios y el ambiente controlado por estufas de cultivo, deben brindar un ambiente adecuado para que la maduración ocurra en 24 hs de un modo similar a lo que sucede in vivo. Las condiciones utilizadas en la mayoría de los laboratorios para lograr este ambiente, involucra el uso de medios de cultivo tales como el TCM-199 suplementado con hormonas (LH, FSH, estradiol, etc.), antioxidantes (glutación, cisteamina, cistina), factores de crecimiento y macromoléculas (suero, albumina), en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 38,5°C y humedad de saturación (Peláez, 2011).

### **2.11.3 Fisiología de la maduración**

Comprende dos etapas:

#### **a) Un periodo de crecimiento**

Crecimiento del ovocito cuando un folículo primordial es liberado de la reserva, comienza a crecer junto con el folículo. El crecimiento de este último es casi completo en el momento de la formación del antro. Mediante los procesos celulares, las células del cúmulo cooperan activamente para lograr el crecimiento del ovocito, ya que establecen contacto estrecho con la membrana celular de este. Durante la formación de la membrana externa del ovocito, es decir la zona pelúcida, se fortalecen las prolongaciones celulares del montículo ovárico (Hafez, 2002).

La maduración de los ovocitos es independiente de:

- La naturaleza de la estimulación folicular
- El diámetro del folículo del que se han originado
- La fuente del líquido folicular o su filtrado de diversos folículos y diferentes hembras.



## **b) Preparación del ovocito para la fecundación**

A partir de la ovogénesis, el núcleo diplotenico del ovocito permanece en la etapa de reposo llamada de núcleo reticular. Normalmente nunca se reinicia la meiosis antes de la oleada ovulatoria de LH/FSH. La oleada ovulatoria de gonadotropinas suprime la producción del factor inhibidor de la meiosis de las células de la granulosa. Dicha oleada es seguida por la modificación metabólica de esa capa folicular. El reinicio de la meiosis es sólo un aspecto de maduración del ovulo; también debe ocurrir la maduración citoplasmática (Castañeda Martinez, 2009).

## **3 CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Materiales:**

#### **3.1.1 Recursos materiales disponibles**

- Computadora
- Programas informáticos
- Sitios de navegación
- Libros acordes a la temática
- Impresora
- Vehículo
- Overol
- Botas
- Casco
- Mandil

#### **3.1.2 Materiales Físicos**

- Termo
- Agujas hipodérmicas 18 G
- Guantes (látex)





- Bomba de aspiración
- Sustancias jabonosas
- Toallas desechables
- Cámara fotográfica

### **3.1.3 Biológicos**

- Ovarios bovinos
- Personal

### **3.1.4 Químicos**

- Alcohol 70%
- Solución salina cloruro de sodio
- Suero fisiológico
- Medio de recolección (PBS + heparina sódica + suero fetal bovino)
- Azul de Tripán
- Aceite mineral

### **3.1.5 Materiales de laboratorio**

- Pipetas automáticas
- Placa petri con fondo cuadriculado
- Estéreo microscopio
- Filtros
- Vaso de precipitación
- Baño maría
- Platina de calefacción
- cajas de cultivo NUNC con pocillos (4 o 5)
- tubos Falcón 15 mL
- tubos Falcón 50 mL
- Puntas de pipetas (tips) amarillos (sin corona)

- tubos Ependorf de 1.5 mL

### **3.1.6 Materiales de oficina**

- cuaderno de campo
- esferos
- medios extraíbles (Memory USB)
- calculadora
- marcadores

## **3.2 Método**

### **3.2.1 El área de estudio**

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción Animal, localizado en la Granja de Irquis de la Universidad de Cuenca. Esta unidad de producción se encuentra ubicada en la parroquia Victoria del Portete, a 22 km de la ciudad de Cuenca. Los habitantes de esta zona, en su mayoría, se dedican a la producción ganadera. La granja Irquis se encuentra situada entre las coordenadas geográficas tales y cuales, a una altura de 2796 msnm. La precipitación anual es de 2500 mm y la temperatura oscila entre 3 a 11°C.



(Gráfico 1. Ubicación de la Granja Irquis).

**Fuente: (Climate- Data. Org, 2016)**



### **3.2.2 Unidad de análisis**

El estudio se realizó con ovarios bovinos obtenidos del camal municipal de Cuenca (EMURPLAG EP), los ovarios se recolectaron de 2 veces por semana y fueron transportados en condiciones adecuadas y en un tiempo no mayor a 3 horas hasta el laboratorio. De acuerdo a lo establecido en el estudio, se utilizaron tres presiones de vacío ( $T_1 = 50$  mmHg,  $T_2 = 65$  mmHg,  $T_3 = 80$  mmHg) para valorar su efecto sobre la viabilidad y capacidad de los ovocitos para madurar y así como también sobre las características morfométricas de los mismos antes y después de la maduración.

### **3.2.3 Metodología**

#### **3.2.3.1 Recolección de ovarios de matadero**

Los ovarios fueron recolectados del Camal Municipal de Cuenca (EMURPLAG EP) dos veces por semana hasta completar 84 ovarios por cada grupo experimental. Estos fueron transportados en una solución salina a una temperatura entre 35 y 37 °C hasta el laboratorio, en un tiempo no mayor a tres horas. Una vez en el laboratorio, los tejidos adyacentes a los ovarios (cuernos uterinos, ligamento, segmentos de oviducto, etc.) fueron removidos con una tijera cuidando de no romper los folículos de la superficie ovárica. Los ovarios fueron lavados con solución fisiológica (cloruro de sodio al 0,9%) estéril dos o tres veces hasta quedar completamente limpios.

#### **3.2.3.2 Método de aspiración con la bomba de vacío del equipo de OPU**

Los ovarios recolectados fueron divididos al azar en los tres grupos experimentales descritos anteriormente: 80, 65 y 50 mmHg. Se procedió a puncionar los folículos antrales que tenían entre 2 y 8 mm de diámetro. La punción se realizó con una aguja de calibre 18G de 1.5 pulgadas de largo conectada a una bomba de vacío (WTA BV 003D ®) por medio de una tubería plástica de 1 mm de diámetro que conducía el contenido folicular aspirado hacia



un tubo Falcón de 50 ml atemperado a 35 - 37 °C que contenía medio de colección PBS. Se registró el número de folículos aspirados por ovario.

Una vez que fueron aspirados los folículos de todos los ovarios de cada tratamiento, esperamos un tiempo de reposo de 10 a 15 minutos antes succionar el pellet formado en el fondo cónico del tubo Falcón con una pipeta Pasteur y lo colocamos en una placa de búsqueda de 95 mm con fondo cuadrulado, haciendo un extendido de 3 a 4 cm de largo por 2 de ancho del líquido folicular.

Inmediatamente después, la placa de búsqueda fue llevada a un estereoscopio para buscar y seleccionar de los complejos cúmulos ovocitos (COCs), que una vez identificados como aptos para la maduración, fueron colocados y transferidos a través de 4 ó 5 gotas de 200 µL de medio Hepes-Fluido Oviductual Sintético (H-SOF), con el fin de lavarlos y librarlos de detritos tisulares, coágulos, etc. Se registró el número de COCs encontrados en el líquido folicular independientemente de su calidad, aunque se desecharon aquellos que por sus características citoplasmáticas no estaban aptos para incluirse en la fase de maduración, tal como se indica a continuación.

### **3.2.3.3 Evaluación de la calidad de los complejos cúmulo ovocitos**

Los COCs obtenidos fueron evaluados y calificados según los criterios de Hawk y Walk (1994) que se describen a continuación:

- Calidad buena (A), cúmulo compacto y varias capas de células (más de 5). de la granulosa adheridas. Asimismo, con citoplasma claramente homogéneo, denso y finamente granulado.
- Calidad intermedia (B), usualmente con granulosa adherida, pero el citoplasma no se ve claramente; cumulo compacto, con pocas a varias capas, cubriendo al menos la mitad de la zona pelúcida. Rango desde homogéneo denso y finamente granulado a granulado de tamaño moderado.



- Calidad mala (C), parcial o completamente expandido con cumulo disperso, falta de células con presencia de material extracelular, cumulo descolorido (café claro o muy oscuro); corona radiata sin cumulo; ovocitos desnudos, granulado grueso o con mezcla de áreas muy claras o muy oscuras; citoplasma descolorido (café claro u oscuro); ovocitos deformes.

Los ovocitos se cuantificaron y calificaron según las características antes mencionadas en categorías A, B y C, y el resultado se expresó en porcentaje. Para la fase de maduración solo se incluyeron ovocitos de calidad A y B, los demás fueron desechados.

#### **3.2.3.4 Determinación de la morfometría de los ovocitos inmaduros**

Luego de la categorización de los COCs (A, B y C), se seleccionaron al azar una muestra representativa (30%) de los que tenían categoría A y B con el fin de determinar las características morfométricas. Para ello los ovocitos se expusieron a un medio compuesto con Hialuronidasa (Sigma) en concentración 1mg/ml (p/v) por un minuto y luego se procedió a pipetear varias veces durante un tiempo máximo de 5 minutos hasta que las células del cúmulo estaban completamente separadas. Una vez denudados los ovocitos, se procedió a lavarlos en medio H-SOF. Luego fueron fotografiados con una cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD) y observados con un microscopio invertido con lente 10X provisto con un software (AmScope V.3.7) diseñado para realizar las mediciones que fueron expresadas en micras.

#### **3.2.3.5 Determinación de la integridad de la membrana celular**

Inmediatamente para determinar la vitalidad de los ovocitos se utilizó el colorante vital Azul Tripán (ácido (3Z, 3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4' diil)di(1Z)hidracin -2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfónico) preparado al 0,15% en solución H-SOF. Los ovocitos se colocaron en gotas del colorante por 10 minutos, y luego fueron evaluados en un estereoscopio de luz diascópica. Si la membrana plasmática del ovocito estaba intacta el citoplasma de este no se teñía; por el contrario, si el colorante traspasa la membrana la integridad de la misma



está comprometida y la célula se consideró muerta o seriamente afectada. Se determinó la proporción de células teñidas para cada uno de los tratamientos y los resultados se expresaron en porcentaje.

### **3.2.3.6 Maduración in vitro de los complejos cumulo ovocitos**

El 70% de los ovocitos restantes de cada grupo se maduraron siguiendo la metodología descrita a continuación:

**Medio de Maduración.** - El medio de maduración consiste en TCM 199 suplementado con 10% Albumina Sérica Bovina (BSA) al 1%, 100 µg/ml de Piruvato de Sodio, 0,75 mg/ml de L-Glutamina, 4 µg/ml de FSH-p (Folltropin®, Bioniche, Canadá), 2 µg/ml de Estradiol y 250 µg/ml de Gentamicina.

**Maduración.** - Los COC's de cada grupo fueron colocados en una misma caja Petri de 35mm en diferentes gotas de 100 µl de medio de maduración previamente estabilizado, manteniendo la relación de 5µl/coc y luego las gotas fueron cubiertas con aceite mineral. Inmediatamente, la placa fue puesta a incubación en una estufa con 5% de CO<sub>2</sub>, humedad 90% y 38.5 °C de temperatura por 22-24 horas.

**Evaluación.** - Tras ser madurados los COC's fueron observados bajo un lupa estereoscópica para determinar la expansión del Cúmulus y para determinar el estado de maduración nuclear (Progresión de la Meiosis) y para ello se denudaron los ovocitos (igual que en el punto 1) y se expusieron por 15 minutos al fluorocromo Hoechst (33342, Sigma) en concentración de 1µg/ml (p/v) y se los evaluó en un microscopio invertido con un sistema de fluorescencia. Aquellos que presentaron expulsión del corpúsculo polar se consideraron como maduros (Metafase II).

**Medición.** - Luego de la evaluación de maduración fueron medidos con la misma metodología igual al punto 2.



### **3.2.3.7 Evaluación de la progresión de la meiosis luego de la maduración in vitro**

Inmediatamente después de realizar el procedimiento anterior, se tomó una muestra del 30 % de COCs que se pusieron a madurar y se procedió a denudarlos de igual manera como se describió anteriormente. Los ovocitos denudados fueron fijados y expuestos al colorante Hoechst durante 30 minutos. Esta tinción que emite fluorescencia al ser expuesta a luz ultravioleta, se une al ADN nuclear y mitocondrial, lo cual permitió valorar la progresión de la meiosis. Se determinó si los ovocitos estaban en estado de vesícula germinal (GV), rotura de la vesícula verminal (GVBD), metafase I (MI), anafase-telofase I (An-Tel I) y metafase II (MII). Se consideraron maduros los ovocitos que alcanzaron la MII, al visualizarse el segundo corpúsculo polar en el espacio perivitelino.

### **3.2.3.8 Determinación de la morfometría de los ovocitos maduros**

Una vez determinada la progresión de la meiosis, los ovocitos fueron sometidos a la determinación de las medidas morfométricas (radio, circunferencia y área) mediante una cámara de alta definición (Excelis AU-600-HD) montada sobre un microscopio de fondo claro con un aumento de 10x, que estaba conectada a un computador provisto de un software para el análisis de imágenes (CaptaVision V.3.6.7 Accu-Scope) calibrado para efectuar las mediciones, cuyos resultados fueron expresado en micras.

### **3.2.4 Diseño experimental y análisis estadístico**

Se consideraron como variables independientes la presión de vacío y el día de recuperación de ovocitos. Como variables dependientes fueron incluidas la tasa de recuperación de ovocitos (número de ovocitos recuperados dividido entre el número de folículos aspirados por cien), el porcentaje de ovocitos viables (número de ovocitos de calidad A y B, con la membrana plasmática intacta dividido del número total de ovocitos recuperados), y la tasa de maduración (número ovocitos que alcanzaron la metafase II dividido entre el número de ovocitos puestos a madurar), así como también las variables morfométricas consideradas (diámetro,



perímetro, área y volumen). Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Systems, 2013) y las diferencias entre medias fueron comparadas mediante el método de los mínimos cuadrados (LSmeans) del SAS.

Se usó el siguiente modelo lineal general:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + S_j + E_k$$

*Donde*

*Y= variables respuestas*

*$\mu$ = media de la población en estudio*

*R= iésima efecto de la presión de vacío*

*S= jésimo efecto del día de recuperación de ovocitos*

*E= késimo efecto del error experimental*





#### 4 CAPITULO IV: RESULTADOS

En este trabajo se procesaron un total de 84 ovarios por cada tratamiento (T1=50 mmHg, T2= 65 mmHg, T3= 80 mmHg), de los cuales se aspiraron 1162, 961 y 1013 folículos para los tratamientos T1, T2 y T3 respectivamente; con una media de folículos aspirados por ovario de 13.8 para T1, 11.4 para T2 y 12.0 para T3.

La Tabla 1 muestra el efecto que tuvo la presión de aspiración folicular con una bomba de vacío sobre la tasa de recuperación, calidad, viabilidad y tasa de maduración de ovocitos bovinos. Se puede apreciar que en la tasa de recuperación no hubo diferencia estadística entre tratamientos, aunque hubo una diferencia numérica de 5,8 y 8,1 puntos porcentuales entre T2 con respecto a T1 y T3 respectivamente.

Además, se puede apreciar en la Tabla 1, que los ovocitos de las calidades A y B fueron proporcionalmente más numerosos en T1 (88.6%) y T2 (88.7%) que en T3 (81.7%;  $P < 0,05$ ), aunque estadísticamente iguales entre sí. En cuanto a los ovocitos viables no se encontró diferencia estadística entre tratamientos; mientras que en la tasa maduración únicamente fueron estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ) T1 y T3, resultando que la aspiración de los folículos con una presión de vacío de 50 mmHg (T1) fue mejor (52.5%) que los aspirados con 80 mmHg (T3; 45.2%).

**Tabla 1. Efecto de la presión de aspiración folicular con una bomba de vacío sobre la tasa de recuperación, calidad, viabilidad y tasa de maduración de ovocitos bovinos (media  $\pm$  error estándar)**

<b>Características de lo ovocitos</b>	<b>Presión de vacío (mmHg)</b>		
	<b>50</b>	<b>65</b>	<b>80</b>
Nro. de ovarios	84	84	84
Nro. folículos aspirados	1162	961	1013
Nro. folículos/ovario	13.8	11.4	12.0
Tasa de recuperación	58.8 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	64.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	56.5 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>
Ovocitos A y B	88.6 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	88.7 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	81.7 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>
Ovocitos viables	83.4 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	85.5 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>	80.4 $\pm$ 4.0 <sup>a</sup>
Ovocitos maduros	52.5 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	49.4 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	45.2 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>

Letras diferentes en cada fila difieren estadísticamente <sup>a,b</sup>(P < 0,05).

En la Tabla 2 se aprecia el efecto que tuvo la maduración, irrespectivamente del tratamiento, sobre las características morfométricas de los ovocitos bovinos, comparando las medidas promedio de cada parámetro antes y después de la misma. Antes de la maduración fueron medidos un total de 453 ovocitos y luego de la maduración se midieron 319, debido a que 30% de ellos fueron usados para determinar la progresión de la meiosis. Como se aprecia en la Tabla 2, todas las características morfométricas fueron mayores antes de la maduración que después de la misma, existiendo una diferencia altamente significativa (P < 0,0001) entre ambos estadios de desarrollo ovocitario. Por ejemplo, el diámetro y el volumen de los ovocitos disminuyó de 124.1 a 121.1  $\mu$ m, en el primer caso, y de 1011711.6 a 937905.8  $\mu$ m<sup>3</sup>, en el segundo caso, constituyendo una reducción de 2,4 y 7.3%, respectivamente.

**Tabla 2. Efecto de la maduración *in vitro* sobre las características morfométricas de ovocitos bovinos aspirados de ovarios de matadero mediante una bomba de vacío (media  $\pm$  error estándar)**

Momento de la medición*	N <sup>ro</sup> ovocitos	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Volumen ( $\mu\text{m}^3$ )
Antes	453	124.1 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	389.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	12141.1 $\pm$ 58.8 <sup>a</sup>	1011711.6 $\pm$ 7368.0 <sup>a</sup>
Después	319	121.1 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup>	380.6 $\pm$ 1.1 <sup>b</sup>	11557.9 $\pm$ 70.3 <sup>b</sup>	937905.8 $\pm$ 8798.0 <sup>b</sup>

\*Antes y después de la maduración *in vitro*. Letras distintas en cada columna difieren estadísticamente <sup>a,b</sup>(P < 0,0001).

Los resultados indican que la presión de vacío con la que fueron aspirados los ovocitos bovinos afectó las características morfométricas antes de iniciarse la maduración *in vitro* (Tabla 3). Como se observa en la Tabla 3, conforme aumentó la presión de vacío utilizada para recuperar los ovocitos, los valores de todas las variables morfométricas disminuyeron, siendo estas significativas entre los tratamientos 1 y 2 (50mmHg y 65mmHg; P < 0,001) y 1 y 3 (50mmHg y 80mmHg; P < 0,02); no obstante, estas variables fueron estadísticamente similares entre los tratamientos 2 y 3. Tomando como referencia el diámetro y el volumen, hubo una reducción de 1,7 y 5,1% entre T1 y T2 respectivamente, y de 1,2 y 3,4% entre T1 y T3 respectivamente.

**Tabla 3. Efecto de la presión de aspiración folicular con una bomba de vacío sobre las características morfométricas de ovocitos bovinos antes de la maduración in vitro (media  $\pm$  error estándar)**

<b>Parámetro Morfométrico</b>	<b>Presión de vacío (mmHg)</b>		
	<b>50 (n=165)</b>	<b>65 (n=154)</b>	<b>80 (n=134)</b>
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	12468,3 $\pm$ 94.2 <sup>a</sup>	11979.4 $\pm$ 100.7 <sup>b</sup>	11975.8 $\pm$ 109 <sup>b</sup>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	395,1 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	387.4 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>	387.0 $\pm$ 1.7 <sup>b</sup>
Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	125.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	123.3 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>	122.2 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup>
Volumen ( $\mu\text{m}^3$ )	1052327.9 $\pm$ 11792.9 <sup>a</sup>	990510.6 $\pm$ 12603.9 <sup>b</sup>	992296.4 $\pm$ 13652.9 <sup>b</sup>

Letras diferentes en cada fila difieren estadísticamente <sup>a,b</sup>(P < 0,001)

Luego de completada la maduración, se constató que las características morfométricas de los ovocitos también fueron afectadas por la presión de vacío utilizada para aspirar los folículos (Tabla 4). No obstante, a diferencia de lo que ocurrió antes de la maduración, la mayor presión de vacío utilizada en el estudio (80 mmHg) no redujo las medidas morfométricas en la misma proporción que lo hizo 65 mmHg en relación con 50 mmHg; las diferencias fueron significativas únicamente entre los tratamientos T1 y T2. En este caso el diámetro y el perímetro se redujeron en 1,5 y 4,3% entre T1 y T2 respectivamente (P < 0,05) y 0,4 y 1% entre T1 y T3 respectivamente (P > 0,05).

**Tabla 4. Efecto de la presión de aspiración con una bomba de vacío sobre las características morfométricas de ovocitos bovinos después de la maduración in vitro (media  $\pm$  error estándar).**

Parámetro Morfométrico	Presión de vacío (mmHg)		
	50 (n=118)	65 (n=109)	80 (n=92)
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	11696.1 $\pm$ 112.4 <sup>a,c</sup>	11362.4 $\pm$ 118.8 <sup>b,c</sup>	11615.4 $\pm$ 130.7 <sup>c</sup>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	382.9 $\pm$ 1.8 <sup>a,c</sup>	377.4 $\pm$ 1.9 <sup>b,c</sup>	381.5 $\pm$ 2.1 <sup>c</sup>
Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	121.9 $\pm$ 0.6 <sup>a,c</sup>	120.1 $\pm$ 0.6 <sup>b,c</sup>	121.4 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>
Volumen ( $\mu\text{m}^3$ )	954686.4 $\pm$ 14072.2 <sup>a,c</sup>	913819.1 $\pm$ 14879.8 <sup>b,c</sup>	945211.9 $\pm$ 16359 <sup>c</sup>

Letras diferentes en cada fila difieren estadísticamente <sup>a,b</sup>(P < 0,05).

La Tabla 5 muestra los parámetros morfométricos considerados en el estudio, de acuerdo al momento en que se hizo la medición y a las presiones de vacío usadas para aspirar los ovocitos de los folículos. Para cada una de las presiones utilizadas, hubo una reducción de los valores morfométricos luego de que los ovocitos completaron el proceso de maduración. Aparentemente este fenómeno fue de menor magnitud en los ovocitos aspirados con una presión de vacío de 80 mmHg, ya que la diferencia de todas las variables entre ambos estadios fue significativa al 4% (P < 0,04), mientras que en los aspirados con 50 y 65 mmHg las diferencias fueron significativas al 0,01% (P < 0,0001).

Por ejemplo, si se consideran el diámetro y el volumen como referencia de lo indicado anteriormente, la magnitud de la reducción para los ovocitos aspirados con 50 mmHg fue de 3,1 y 9,3% respectivamente, para los aspirados con 65 mmHg de 2,6 y 7,7% respectivamente, y para los aspirados con 80 mmHg de 1,4 y 4,7 respectivamente.

**Tabla 5. Efecto de la presión de aspiración de folículos bovinos con una bomba de vacío sobre algunos parámetros morfométricos de ovocitos bovinos antes y después de la maduración *in vitro* (media  $\pm$  error estándar).**

Parámetro Morfo-métrico	Momento de la medición*	Presión de vacío (mmHg)		
		50	65	80
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Antes	12468.3 $\pm$ 94.2 <sup>a</sup>	11979.4 $\pm$ 100.7 <sup>a</sup>	11975.8 $\pm$ 109 <sup>b</sup>
	Después	11696.1 $\pm$ 112.4 <sup>b</sup>	11362.4 $\pm$ 118.8 <sup>b</sup>	11615.4 $\pm$ 130.7 <sup>c</sup>
Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Antes	395.1 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	387.3 $\pm$ 1.6 <sup>a</sup>	387 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>
	Después	382.9 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	377.4 $\pm$ 1.9 <sup>b</sup>	381.5 $\pm$ 2.1 <sup>c</sup>
Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	Antes	125.8 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	123.3 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	123.2 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
	Después	121.9 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	120.1 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	121.4 $\pm$ 0.7 <sup>c</sup>
Volumen ( $\mu\text{m}^3$ )	Antes	1052327.9 $\pm$ 11792.9 <sup>a</sup>	990510.6 $\pm$ 12603.9 <sup>a</sup>	992296.4 $\pm$ 13652.9 <sup>b</sup>
	Después	954686.4 $\pm$ 14072.2 <sup>b</sup>	913819.1 $\pm$ 14879.8 <sup>b</sup>	945212 $\pm$ 16359 <sup>c</sup>

Letras diferentes en cada columna y para cada parámetro morfométrico difieren estadísticamente <sup>a,b</sup>(P < 0,0001) <sup>b,c</sup>(P < 0,04). \*Antes y después de la maduración *in vitro*.



## 5 CAPITULO V: DISCUSIÓN

El desarrollo de este trabajo de investigación pretende contribuir a validar un método para obtener el mayor número de ovocitos viables, tanto recuperados de ovarios de matadero como en animales vivos, para los programas de producción in vitro de embriones (PIV) en la región. En tal sentido, se ha demostrado que existe una relación entre la calidad y la maduración ovocitaria, ya que los ovocitos de calidad superior, es decir los de tipo A tienen mayor tasa de maduración que los de calidad inferior (Cañon *et al.*, 2011).

De manera que, usando como modelo experimental la aspiración de ovocitos bovinos obtenidos en el camal municipal del cantón Cuenca, mediante la bomba de vacío de un equipo de OPU, pudo determinarse cuál es la presión de aspiración más adecuada en las condiciones geográficas y ambientales de la región de la Sierra sur del Ecuador. La información obtenida puede ser utilizada como referencia para la obtención del mayor número de ovocitos de buena calidad de animales vivos mediante OPU, que garantice una adecuada producción de embriones para la mejora genética del ganado bovino de la región.

### 5.1 Tasa de recuperación de ovocitos

En este estudio, la tasa de recuperación de ovocitos fue estadísticamente similar entre tratamientos, difiriendo con los resultados obtenidos por Ward *et al.* (2000), quienes evaluaron cuatro presiones de vacío: 30, 50, 70 y 90 mmHg, y utilizaron, al igual que en el presente estudio, la tecnología de ovum pick up (OPU), y compararon con un tratamiento control en el cual los ovocitos de matadero fueron aspirados con una jeringa. Los resultados de estos autores mostraron que la proporción de ovocitos aspirados con 30 (69.4%) y 50 mmHg (68.2%) fue mayor ( $P > 0,05$ ) que los recuperados con 70 (60.3%) y 90 mmHg (52.2%), que fueron similares entre sí; lo cual indica que con presiones mayores a 50 mmHg la tasa de recuperación de ovocitos tiende a disminuir.



Similarmente, otro estudio en el que se aspiraron ovocitos bovinos con OPU en vaconas estimuladas con eCG, se encontró que con una presión de vacío de 30 mmHg y una aguja de 16G se recuperaron 1,3 más COC's que 150 mmHg y una aguja de 18G (Vos *et al.*, 1999). Contrariamente a lo que cabría suponer, las evidencias experimentales indican que presiones de vacío  $\leq 50$  mmHg han sido más efectivas para recuperar mayor número de ovocitos que las presiones mayores (Vos *et al.*, 1999; Ward *et al.* 2000).

Sin embargo, otros autores que compararon cinco presiones de vacío (50, 70, 90, 110, 130 mmHg), indicaron que irrespectivamente del calibre de aguja utilizada (18G, 19G Y 21G), la tasa de recuperación de ovocitos vario entre 55 y 70%, y tendió a ser estadísticamente mayor en la medida que aumentó la presión de vacío (Bols *et al.*, 1996).

El presente estudio, no obstante, coincide con un trabajo realizado por Hashimoto *et al.* (1999), cuyo objetivo fue investigar los efectos de la presión de aspiración y el diámetro de la aguja utilizada en la recuperación y en la calidad de los COCS recolectados de ovarios de matadero y en vacas vivas. Ellos compararon cuatro presiones de aspiración (40, 80, 120 y 160 mmHg) con agujas de calibre 18 y 21 G. En los resultados de este trabajo no existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en cuanto a la tasa de recuperación se refiere, lo cual demostró que independiente del calibre de la aguja, el incremento de la presión de aspiración no afectó la tasa de recuperación de ovocitos.

## **5.2 Calidad y viabilidad de los ovocitos**

Este estudio demostró que la presión de vacío utilizada para recuperar ovocitos bovinos de ovarios de matadero afectó la calidad de las estructuras recuperadas. Así, con presiones  $\leq 65$  mmHg (T1 y T2) se recuperaron más ovocitos tipo A y B ( $P < 0,05$ ) que con 80 mmHg (T3), lo cual significa que al incrementar la presión de aspiración por encima de 65 mmHg se afectó la calidad de los ovocitos recuperados.





Estos hallazgos coinciden con un trabajo realizado por Bols *et al.* (1996), en el cual estudiaron el efecto de la presión de aspiración y el calibre de la aguja sobre la morfología de los COCs y la capacidad de desarrollo de los ovocitos. Ellos utilizaron cinco presiones de vacío (T1=50 mmHg, T2=70 mmHg, T3= 90 mmHg, T4= 110 mmHg y T5= 130 mmHg) y tres calibres de aguja (18G, 19G Y 21G). Estos autores encontraron que independientemente del calibre de la aguja usada, la proporción de ovocitos rodeados por una capa compacta de células de cúmulo (ovocitos de mejor calidad) decreció en la medida en que aumentó la presión de vacío, a la vez que aumentaron los ovocitos desnudos (menos competentes para madurar) y disminuyeron los de blastocitos obtenidos, siendo esto último particularmente evidente cuando las presiones de vacío fueron > a 90 mmHg (Bols *et al.*, 1996).

Los hallazgos de este estudio y los señalados en el párrafo anterior (Bols *et al.*, 1996) coinciden con los publicados por Fry *et al.*, (1997), quienes probaron dos tipos de agujas (17G Y 20G) y cuatro presiones de vacío (25, 50, 75 y 100 mmHg) para aspirar folículos de ovarios bovinos de matadero y evaluar su impacto en la cantidad y calidad de los ovocitos inmaduros. Según estos autores, la cantidad de ovocitos viables aumentó significativamente de 38%, en aquellos aspirados con una presión de 25 mmHg, a 45% si se utilizaba la presión de 50 mmHg, pero decreció a 30% cuando se aplicó una presión de 100 mmHg, lo cual indica que al utilizar presiones superiores a 75 mmHg la calidad de los ovocitos se afecta, lo cual coincide con nuestro trabajo.

En este estudio se determinó que no hubo diferencia significativa en la viabilidad de los ovocitos por efecto de las diferentes presiones. Como se aprecia en la Tabla I, los valores de viabilidad ovocitaria variaron entre 80.4 y 85.5%, lo cual es indicativo de que las presiones de vacío usadas no afectaron la integridad de la membrana plasmática. Estos resultados son ligeramente inferiores a los obtenidos por Alvarado (2017), quien empleando el mismo método de determinación de la viabilidad ovocitaria, y una presión de vacío de 90 mmHg, obtuvo valores de 87.3%. Por otra parte, Collantes (2011) usando como método aspiración la



jeringa, obtuvo 50.2% de ovocitos viables, lo cual es inferior al logrado en este estudio. Este autor indicó, además, que a mayor tiempo para recuperar los ovocitos la tasa de viabilidad disminuyó, y 3 horas parece ser el tiempo óptimo señalado por varios autores para que el ovocito mantenga la integridad de su citoplasma.

### 5.3 Maduración de ovocitos (progresión de la meiosis)

En esta investigación se señaló que no existió diferencia significativa en la maduración de los ovocitos aspirados con 50 ( $52.5 \pm 2.1\%$ ) y 65 mmHg ( $49.4 \pm 2.1$ ), aunque el aumento de la presión de aspiración (80 mmHg) la disminuyó significativamente ( $45.2 \pm 2.1\%$ ;  $P < 0.05$ ) en relación a las otras dos presiones de vacío utilizadas.

Restrepo (2008), en su investigación de maduración in vitro obtuvo valores de  $39.8 \pm 2.38$  y  $50.3 \pm 2.59\%$  con suero y sin suero fetal bovino, respectivamente, utilizando para aspirar los ovocitos una jeringa de 5 ml acoplada a una aguja de 18G; lo cual representan resultados comparables a los del presente estudio.

No obstante, otros autores han señalado tasas de maduración superiores: 93,8% (Gardón, 1999), 79.45% (García y Martínez, 2013) y 72.4% (Feria., et al 2013), y también inferiores: 42.6, 45.0, 40.7 y 37.7% (Santa Cruz *et al.*, 2014), a los de esta investigación.

Ha sido ampliamente documentado que la presión de vacío afecta el número y calidad de los ovocitos aspirados (Bols et al., 1996; Fry et al., 1997; Hasler et al., 1998; Vos et al., 1999; Ward et al., 2000), así como la competencia de estos para madurar, clivar y progresar al estado de blastocito (Bols et al., 1996; Vos et al., 1999; Ward et al., 2000). Aparentemente las fuerzas físicas que se ponen en juego durante el proceso de aspiración, pueden afectar la capacidad funcional de los ovocitos, tal como lo demuestra este y numerosos estudios publicados previamente. El vacío utilizado para la colección de los ovocitos debe ser considerado cuidadosamente, ya que, durante la aspiración, estos son despojados de las células del cumulo oóforo (Hasler, 1998; Ward et al., 2000),



que son imprescindibles para facilitar su maduración (Zhang et al., 1995), fecundación (Cox et al., 1993), formación de pronúcleos masculinos (Chian et al., 1994) y desarrollo al estado de blastocisto (Chian et al., 1995; Zhang et al., 1995).

#### 5.4 Características morfométricas.

Las medidas morfométricas obtenidas antes de la maduración son semejantes con las obtenidas por Alvarado (2017), quien comparó la calidad de ovocitos obtenidos de ovarios de camal y de vacas criollas mediante OPU, con una bomba de vacío calibrada en 90 mmHg y una aguja 18G para ambos tratamientos. Tomando como referencia el diámetro ovocitario, los ovocitos recolectados de ovarios de camal fueron estadísticamente superiores ( $P < 0,05$ ) a los obtenidos por OPU en vacas criollas ( $127.2 \pm 0.6$  versus  $122.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$  respectivamente) (Alvarado, 2017). En este estudio, el diámetro promedio de los ovocitos antes de ser madurados fue de  $124.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , y varió según la presión de vacío utilizada para obtenerlos, entre  $121,7 \pm 0,4$  y  $123,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ . Igualmente, el diámetro encontrado en este estudio es comparable al promedio ( $122,6 \mu\text{m}$ ) de ovocitos bovinos de categoría A y B señalado por Wit y Kruip (2001) que variaron entre  $120,9$  y  $129,9 \mu\text{m}$ .

Asimismo, se constató que irrespectivamente del vacío utilizado, los ovocitos disminuyeron todas las medidas morfométricas. Por ejemplo, el diámetro de los estos disminuyó de  $124.1$  a  $121.1 \mu\text{m}$ , coincidiendo con los resultados obtenidos por Suzuki *et al.* (1994), quienes investigaron las alteraciones superficiales del ovocito bovino durante y después de la maduración y la fertilización in vitro. Ellos obtuvieron una media de  $99 \mu\text{m}$  antes de la maduración que se redujo a  $80 \mu\text{m}$  después de la misma, haciendo evidente que de esta manera que antes de la maduración las dimensiones morfométricas de los ovocitos bovinos son mayores que después de la misma.

El diámetro del ovocito parece estar relacionado con la competencia de estos para madurar. En un estudio los ovocitos colectados de ovarios de matadero fueron clasificados según su diámetro en estructuras de  $<100$ ,  $100 <110$ ,  $110 < 120$ ,  $>$



120  $\mu\text{m}$  y puestos a madurar; se comprobó que la tasa de progresión a metafase II aumentó conforme el diámetro de los ovocitos de cada grupo era mayor: 21.2, 42.3, 75.9 y 80.7%, respectivamente (Fair et al., 1995). Aparentemente, la competencia de los ovocitos para reanudar la meiosis se adquiere cuando estos alcanzan un diámetro de alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , mientras que es necesario que este sea de 110  $\mu\text{m}$  para lograr la competencia para completarla (Hytel et al., 1997).

Como se indicó anteriormente, las presiones de vacío utilizadas en este estudio afectaron el diámetro y demás medidas morfométricas evaluadas, de manera que los ovocitos sometidos a un vacío mayor (65 y 80 mmHg) antes de iniciarse la maduración redujeron su diámetro. Esto pudiera tener importantes implicaciones funcionales que podrían explicar la menor capacidad de los ovocitos expuestos a las fuerzas físicas generadas durante la aspiración con altas presiones de vacío para madurar, ser fecundados y progresar a al estadio de blastocito, blastocito expandido o blastocito eclosionado (Bols et al., 1996; Vos et al., 1999; Ward et al., 2000).

Luego de la maduración, solo los ovocitos aspirados con 65 mmHg tuvieron un diámetro de casi 2  $\mu\text{m}$  menos que los obtenidos con 50 mmHg ( $P < 0,05$ ), no obstante, contrariamente a lo que podría esperarse, los sometidos a mayor presión de vacío (80 mmHg) fueron solo 0,5  $\mu\text{m}$  menores ( $P > 0,05$ ). Aparentemente, durante el proceso de maduración estos últimos fueron afectados en menor magnitud por el proceso de reducción del diámetro que estos experimentan en forma aparentemente natural, como lo demuestra el estudio de Suzuki et al. (1994) y los resultados de este estudio (Tabla 2). Finalmente, estos hallazgos son inéditos dado que en ninguna de las publicaciones consultadas se ha reportado el efecto de la presión de vacío sobre las características morfométricas de ovocitos bovinos.

## **6 CAPITULO VI: CONCLUSIONES**

- La tasa de recuperación de ovocitos no fue afectada por las presiones utilizadas para aspirar los ovocitos de los folículos.
- La calidad de los ovocitos se vio claramente afectada por la presión de vacío con la cual se aspiraron los mismos, pudiéndose apreciar que a presiones superiores a 65 mmHg el porcentaje de recuperación de ovocitos de categoría A y B fue menor, por lo que mientras más aumentó la presión a partir de este rango, la calidad de ellos disminuyó significativamente.
- La viabilidad de los ovocitos no se vio afectada por las presiones de vacío usadas para su recuperación desde los folículos. Indicando de esta manera, que el incremento en la presión hasta 80 mmHg no afectó la integridad de la membrana plasmática de los mismos.
- La presión de vacío afectó la capacidad de los ovocitos para completar la meiosis I, pero este efecto fue significativo únicamente en aquellos recuperados con 80 mmHg comparado con los obtenidos con 50 mmHg.
- Al establecer la relación existente entre la morfometría y la maduración de los ovocitos, se pudo apreciar que independientemente de la presión de vacío, todas las características morfométricas analizadas fueron mayores antes de la maduración que después de la misma.
- La presión de vacío con la que los ovocitos fueron aspirados de los folículos afectó las variables morfométricas evaluadas, ya que estas fueron menores en los ovocitos recuperados con 65 y con 80 mmHg.



## 7 CAPITULO VII: RECOMENDACIONES.

- Según con los resultados obtenidos en esta investigación se recomienda que al momento de recuperar ovocitos de ovarios de matadero con la bomba de vacío se utilicen presiones  $\leq 65$  mmHg, ya que las superiores a esta pueden afectar la calidad de los ovocitos obtenidos.
- Asimismo, se recomienda hacer una segunda fase de esta investigación en la cual se evalúe el efecto de las presiones de vacío utilizadas en este estudio para determinar su efecto sobre las tasas de fecundación, clivaje y desarrollo de blastocistos.
- De la misma manera, se recomienda evaluar el efecto de las presiones de vacío usadas en la presente investigación, para aspirar ovocitos de vacas mediante la técnica del ovum pick-up, y así confirmar o no los hallazgos encontrados en este estudio



## 8 CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Alvarado, J.M. (2017). *Evaluación de la calidad de ovocitos provenientes de vaconas criollas y ovarios de matadero*. “Tesis previa a la obtención del título de Magister en Reproducción animal”. Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuenca, Ecuador.
- Barba, E.M. (2016). *Evaluación de dos crioprotectores en la congelación de embriones bovinos producidos in vitro, en medios sintéticos*. “Tesis previa a la obtención del título de Magister en Reproducción animal”. Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Agropecuarias, Cuenca, Ecuador.
- Báez, F., Pirela, A., Landinez, J., Villamediana, P. (2009). Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad de ovocitos bovinos maduros in vitro. Boletín del centro de investigaciones biológicas 43:197–210.
- Becaluba, F. (2007). Factores que afectan la superovulación en bovino. Especialista en Reproducción, Bs. As., Argentina.
- Benavides, L. (2012). Efecto del Método de Colección y Tensión de Oxígeno sobre el desarrollo embrionario de Ovocitos Bovinos fecundados y cultivados In Vitro. Obtenido de Cybertesis Repositorio de Tesis Digitales: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1571>
- Bols, P., Van Soom, A., Ysebaert, M., Vandenheede, J., & de Kruif, A. (1996). Effects of spiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. Theriogenology, 45:1001-1014.
- Brackett, B.G., Zuelke, K.A. 1993. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. Theriogenology 39:43-64.



- Campabadal, C. (2009). Efecto de la nutrición sobre la reproducción. Asociación Americana de Soya-IM Latino América Congreso Lechero San Carlos, Costa Rica.
- Cañon, K., Demyda, S., & Moreno, M. (2011). Evaluación citogenética de ovocitos madurados in vitro, en vacas criollas en Ecuador - resultados preliminares. Disponible en: SPERMOVA: <http://spermova.pe/site2/files/Revistas/Rev.No.1Vol1/113-115EVALUACION-CITOGENTICA-DE-OVOCITOS-MADURADOS-IN-VITRO-EN-VACAS-CRIOLLAS-ECUADORcaon2011-113-115.pdf>
- Catalá, M., Morato, R., Romaguera, R., Izquierdo, D., Paramio, T. (2009). Estudio de la actividad mitocondrial de ovocitos de cordera seleccionados mediante el test del BCB (azul de cresol brillante). Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II: 684-686.
- Collantes, J. (2011). *Viabilidad de los ovocitos bovinos obtenidos post mortem, para la producción de embriones in-vitro*. "Tesis previa a la obtención del título de Médico Veterinario". Universidad de Guayaquil Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Guayaquil, Ecuador.
- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol Reprod Dev.* (42):437-442.
- Feria, A., Montiel, F., Canseco Sedan, R., Zárate, O. (2013). Medio alternativo para maduración in vitro de ovocitos bovinos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Veracruzana. Veracruz, México.





- Fernández, Á. (2003). Dinámica folicular: funcionamiento y regulación. Disponible en: Sitio Argentino de Producción Animal.: [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/23ondas\\_foliculares.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/23ondas_foliculares.pdf)
- Fernández, A., Díaz, T., Muñoz, G. (2007). Producción in vitro de embriones bovinos. Revista de la facultad de ciencias veterinarias UCV. 48:51-60.
- Filipiak, Y., Larocca, C. (2012). Utilización del azul de tripán para diferenciar ovocitos bovinos vivos y muertos en fertilización in vitro. Biotecnología de la Reproducción. Facultad de Veterinaria. UdelaR. Montevideo. Uruguay.
- Fry, R.C., Niall, E.M., Simpson, T.L., Squires T.J., Reynolds, J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology 47: 977-987.
- Gallegos, M. (1998). *Fertilización in vitro de ovocitos bovinos*. "Tesis previa a la obtención el grado de doctor en ciencias pecuarias. Universidad Autónoma de Nueva León, Nueva León México.
- García Recillas, J., & Martínez Quintero, J. (2013). Implementación de un protocolo de Fertilización in vitro en bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Gardón, J. (2009). Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios del desarrollo embrionario, obtenidos por fertilización in vitro. Disponible en: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/407/13079219.pdf?sequence=2>



- Gardón, J. (1999). Utilización de antisuero H-Y para sexar embriones bovinos en diferentes estadios de desarrollo embrionario obtenidos, por fertilización in vitro. Disponible en: Universidad de Córdoba Facultad de Veterinaria:  
<http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/407/13079219.pdf?sequence=2>
- Gigli, I., Russo, A., & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. Disponible en: Sitio Argentino de Producción Animal:  
[http://produccionbovina.com.ar/informacion\\_tecnica/inseminacion\\_artificial/84-dinamica\\_ovarica.pdf](http://produccionbovina.com.ar/informacion_tecnica/inseminacion_artificial/84-dinamica_ovarica.pdf)
- González, R., Soto, E., Delgado, N., Portillo, G., De Ondiz, A., & Velarde, J. (1992). Comparacion de dos métodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. Revista científica, FCV de LUZ, II, 11-13. Disponible en:  
[http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23692/2/articulo\\_2.pdf](http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23692/2/articulo_2.pdf)
- González, V. (2012). "Evaluación de la expansión de las células del cúmulo en la maduración in vitro de tres tipos morfológicos de oocitos procedentes de ovarios de vacas de matadero de la ciudad de Loja con dos medios de maduración". Disponible en: Universidad Nacional de Loja:  
<http://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5394/1/Tesis%20%E2%80%9CEVALUACI%C3%93N%20DE%20LA%20EXPANSI%C3%93N%20DE%20LAS%20C%C3%89LULAS.pdf>
- Hashimoto, S., Takakura, R., Kishi, M., Sudo, T., Minami, N., Yamada, M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. Theriogenology 51: 757-765.



- Hawk, H. W., and R. J. Wall. "Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. selection of oocytes and zygotes." Elsevier; Theriogenology 41: pag: 1571- 1583. 1994.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47:23-32.
- INIA. (2007). Comparación entre novillas y vacas como donantes de ovocitos para la como donantes de ovocitos para la producción in vitro de embriones n in vitro de embriones. Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos. Madrid, España.
- Landínez, J., Villamediana, P., Hernández, H., & Soto, E. (2010). Efecto del tiempo de maduración in vitro de ovocitos bovinos sobre la progresión meiótica. 6: 659-664 Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95916206013>
- Lorenzo, P.L. (1992). *Maduración in vitro de oocitos de ganado vacuno*. "Tesis doctoral". Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Martínez, Y. (2013). Análisis de la morfología ovocitaria en bovina previa a fecundación in vitro. Disponible en: Universidad de Oviedo Máster universitario en biología y tecnología de la reproducción: <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17398/1/TFM%20Yaiza%20Martinez.pdf>
- Mermillod, P., Dalbiès, R., Uzbekova, S., Thélie, U., Traverso, J., Perreau, C., Papillier, P., Monget, P. (2008). Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle?. Reprod Domest Anim. 43: 393-400.
- Mucci, N., Aller, J.F., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Alberio, R.H. 2006. Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch. Med. Vet. 38, 2.



- Ongaratto, F. L. (2013). *Control del desarrollo folicular para la obtención de cocs por aspiración guiada por ultrasonografía*. "Tesis Para Obtener el Grado Académico de Magíster en Reproducción Bovina". Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Agropecuarias, Córdoba, Argentina.
- Palma, G. (2001). *Biología de la reproducción*. Buenos Aires: Balcarce.
- Peláez, V. (2011). Producción in vitro de embriones. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3053/1/mv170.pdf>
- Paula-Lopes FF de, Lima RS, Risolia PHB, Ispada J, Assumpção MEOD'Á, Visintin JA. (2012). Heat stress induced alteration in bovine oocytes: functional and cellular aspects. *Animal Reproduction*, 9( 3): 395-403.
- Puerta, L.F. (2006). *Aplicación de la biotecnología de la aspiración folicular (OPU) y fecundación in vitro (FIV) como herramienta para un mejor aprovechamiento de las hembras cebuinas dentro del plan de modernización del hato ganadero colombiano*. "Trabajo de grado para optar el título de zootecnista". Universidad de la Salle, Bogotá, Colombia.
- Pujol, M., López-Bejar, M., Paramio, M. T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*, 61(4), 735-744.
- Quispe, C., Fernández, E., Ancco, E., Oriundo, K., Mellisho, E. (2015). Efecto de la raza de la donadora sobre la cantidad y calidad de ovocitos recuperados por aspiración folicular guiada por ultrasonografía transvaginal. *ASPRA* 5(1): 59-62.



- Ramírez, O., Jiménez, C. (2016). Recolección de oocitos para procedimientos in Vitro en bovinos. Revista Acovez Volumen 24 No. 1.
- Restrepo B, G., Vásquez, N. (2009). Efecto de la maduración in vitro de oocitos bovinos con suero fetal bovino sobre su actividad mitocondrial post-desvitrificación. Rev.MVZ Córdoba 14(1):1554-1562.
- Rivera Gaona, Miguel. (2013). Manual de Biotecnología Reproductiva en Bovinos. Universidad de Tolima, Tolima, Colombia.
- Robledo, J., Herrera, J., Cajero, M., Navarro, M., & García, A. (2009). Evaluación de dos medios de maduración in vitro para la producción de embriones ovinos. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/939/93911243009.pdf>
- Ruiz, S. (2006). OVUM PICK UP (OPU) en bovinos: Aplicaciones en Biotecnología de la reproducción. Dpto. Fisiología. Facultad de Veterinaria, UM, Murcia, España.
- Santa Cruz, C., Huanca, W., Condori, R., Ampuero, A. (2014). Uso de Macromoléculas sobre la Tasa de Maduración y Desarrollo Embrionario in vitro de Ovocitos Bovinos. Rev Inv Vet Perú 25(4): 487-493.
- Segura, G., Cortez, J., & Cayo, I. (2015). Capacidad de maduración in vitro de ovocitos obtenidos de folículos de tres tamaños diferentes en bovinos. ASPRA 5(1): 106-109.
- Sendaga, S., Cetina, Y., Alana, M., Gerd, K., & Niemann, H. (2008). Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. Obtenido de



Science

Direct:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432008000109>

- Seneda , M., Fernandes da Silva, K., Constantino, M., Garbelini, R., Aires, L., & Fortes, J. (2004). Aspiración de ovocitos por ultrasonografía transvaginal. Obtenido de InvitroBrasil: [http://invitrobrasil.com.br/pdf/artigos-publicados/14 Seneda MM et al 1.pdf](http://invitrobrasil.com.br/pdf/artigos-publicados/14_Seneda_MM_et_al_1.pdf)
- Sierra, D.K. (2015). *Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán*. “Tesis de grado previa la obtención del título de Ingeniera en Desarrollo Integral Agropecuario”. Universidad Politécnica Estatal del Carchi, Tulcán, Ecuador.
- Statistical Analysis Systems Institute, 2002. User’s Guide, (SAS Institute Inc., Cary, NC)
- Suzuki, H., Yang, X., Foote, R. Surface alterations of the bovine oocyte and its investments during and after maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 38: 421-430.
- Van Wagtendonk-de Leeuw AM. 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, 15(5):914-925
- Vos P.L.A.M.; Henriksen P.J.M.; Dielman, S.J. 1999. Results of oocytes from eCG stimulated bovine follicles at the time of preovulatory LH surge are severely affected by the system of aspiration. *Theriogenology* 51:310.
- Wandji, S.A., Eppig, J.J., Fortune, J.E. 1996b. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenol.* 45:817-832.
- Wandji, S.A., Srsen, V., Nathanielsz, P.W., Eppig, J.J., Fortune, J.E. 1997. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Hum. Reprod.* 12:1993-2001.



- Wandji, S.A., Srsen, V., Voss, A.K., Eppig, J.J., Fortune, J.E. 1996a. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. Biol. Reprod. 55:942-948.
- Ward F.A., Lonergan P., Enright B.P., Boland M.P. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pickup technology. Theriogenology, 54:433-446.
- Wit, A.A.C., Kruip, Th.A.M. (2001). Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for a-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. Animal Reprod. Sci. 65:51-65.
- Zárate, O.E. (2006). *Comparación de dos métodos de criopreservación de ovocitos bovinos*. "Tesis para obtener el grado de maestro en ciencia animal". Universidad Veracruzana, Veracruz, México.



## 9 ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de varianza del paquete estadístico SAS en las pruebas de maduración.

Sistema SAS 20:43 Saturday, March 6, 2017

Procedimiento GLM  
Información del nivel de clase  
Clase Niveles Valores  
maniobra 12 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
pres 3 50 65 80

Número de observaciones 36

Variable dependiente: **recup (tasa de recuperación)**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	8074.28024	621.09848	4.06	0.0019
Error	22	3369.64408	153.16564		
Total correcto	35	11443.92432			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	recup Media
0.705552	20.64029	12.37601	59.96045

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
maniobra	11	7653.120050	695.738186	4.54	0.0012
pres	2	421.160193	210.580096	1.37	0.2738

Variable dependiente: **ovoAB (Ovocitos A y B)**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	2495.183083	191.937160	3.19	0.0081
Error	22	1323.665514	60.166614		
Total correcto	35	3818.848597			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ovoAB Media
0.653386	8.983749	7.756714	86.34161





Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
maniobra	11	2108.016038	191.637822	3.19	0.0100
pres	2	387.167045	193.583523	3.22	0.0595

Variable dependiente: **ovoV (ovocitos viables)**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	4963.907698	381.839054	2.00	0.0726
Error	22	4190.268166	190.466735		
Total correcto	35	9154.175865			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ovoV Media
0.542256	16.60193	13.80097	83.12871

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
maniobra	11	4802.059293	436.550845	2.29	0.0471
pres	2	161.848405	80.924203	0.42	0.6591

Variable dependiente: **ovoM (ovocitos madurados)**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	13	2571.789054	197.829927	3.73	0.0032
Error	22	1166.397799	53.018082		
Total correcto	35	3738.186853			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	ovoM Media
0.687978	14.84429	7.281352	49.05154

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
maniobra	11	2254.386258	204.944205	3.87	0.0034
pres	2	317.402795	158.701398	2.99	0.0708

Procedimiento GLM  
Medias de cuadrados mínimos

	Error	Número	
pres	recup LSMEAN	estándar	Pr >  t
50	58.7927600	3.5726465	<.0001
65	64.6094769	3.5726465	<.0001
80	56.4791095	3.5726465	<.0001

Medias de cuadrados mínimos para el efecto pres  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)



Variable dependiente: recup

i/j	1	2	3
1		0.2620	0.6515
2	0.2620		0.1218
3	0.6515	0.1218	

pres	ovoAB	Error	Número	LSMEAN
		LSMEAN	estándar	
50	88.6138886	2.2391705	<.0001	1
65	88.7068372	2.2391705	<.0001	2
80	81.7041138	2.2391705	<.0001	3

Medias de cuadrados mínimos para el efecto pres  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Variable dependiente: ovoAB

i/j	1	2	3
1		0.9768	0.0401
2	0.9768		0.0377
3	0.0401	0.0377	

pres	ovoV	Error	Número	LSMEAN
		LSMEAN	estándar	
50	83.4526585	3.9839965	<.0001	1
65	85.5484031	3.9839965	<.0001	2
80	80.3850792	3.9839965	<.0001	3

Medias de cuadrados mínimos para el efecto pres  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Variable dependiente: ovoV

i/j	1	2	3
1		0.7135	0.5916
2	0.7135		0.3694
3	0.5916	0.3694	

pres	ovoM	Error	Número	LSMEAN
		LSMEAN	estándar Pr >  t	
50	52.4964387	2.1019452	<.0001	1
65	49.4086700	2.1019452	<.0001	2
80	45.2495190	2.1019452	<.0001	3

Medias de cuadrados mínimos para el efecto pres  
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)



Variable dependiente: **ovoM**

i/j	1	2	3
1		0.3102	0.0233
2	0.3102		0.1757
3	0.0233	0.1757	

**proc sort;** by maniobra oper tiempo pres;  
**proc glm;** class maniobra pres; **model** recup ovoAB ovoV ovoM = maniobra pres;  
**lsmeans** pres /p s;  
**run;**

## Anexo 2. Análisis de varianza del paquete estadístico SAS en las pruebas de morfometría.

Sistema SAS 04:22 Tuesday, March 9, 2017 33

Procedimiento GLM		
Información del nivel de clase		
Clase	Niveles	Valores
momento	2	1 2
maniobra	12	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
presion	3	50 65 80

Número de observaciones 775

Variable dependiente: **area**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	49	423669968	8646326	5.94	<.0001
Error	725	1054466374	1454436		
Total correcto	774	1478136342			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	area Media
0.286624	10.11394	1206.000	11924.14

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
momento	1	60020869.0	60020869.0	41.27	<.0001
maniobra	11	134311190.8	12210108.3	8.40	<.0001
presion	2	22333859.6	11166929.8	7.68	0.0005
momento*presion	2	5104156.7	2552078.4	1.75	0.1737
maniobra*presion	22	71234879.4	3237949.1	2.23	0.0011
momento*maniobra	11	100256673.1	9114243.0	6.27	<.0001



Variable dependiente: perim

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	49	110016.6320	2245.2374	5.98	<.0001
Error	725	272412.6545	375.7416		
Total correcto	774	382429.2865			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	perim Media
0.287678	5.015827	19.38406	386.4578

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
momento	1	15076.13828	15076.13828	40.12	<.0001
maniobra	11	35787.10541	3253.37322	8.66	<.0001
presion	2	5848.76973	2924.38486	7.78	0.0005
momento*presion	2	1379.63987	689.81993	1.84	0.1602
maniobra*presion	22	18246.60437	829.39111	2.21	0.0012
momento*maniobra	11	26121.11120	2374.64647	6.32	<.0001



Variable dependiente: **diam**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	49	11149.17237	227.53413	5.98	<.0001
Error	725	27602.55429	38.07249		
Total correcto	774	38751.72666			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	diam Media
0.287708	5.015942	6.170291	123.0136

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
momento	1	1527.945434	1527.945434	40.13	<.0001
maniobra	11	3626.975195	329.725018	8.66	<.0001
presion	2	593.018333	296.509166	7.79	0.0005
momento*presion	2	139.844388	69.922194	1.84	0.1601
maniobra*presion	22	1849.147561	84.052162	2.21	0.0012
momento*maniobra	11	2646.187174	240.562470	6.32	<.0001

Variable dependiente: **vol**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	49	6.5731056E12	134145012375	5.88	<.0001
Error	725	1.6529522E13	22799340957		
Total correcto	774	2.3102628E13			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	vol Media
0.284518	15.34658	150994.5	983896.8

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
momento	1	961253846221	961253846221	42.16	<.0001
maniobra	11	2.0298796E12	184534507439	8.09	<.0001
presion	2	344826222157	172413111079	7.56	0.0006
momento*presion	2	76581827616	38290913808	1.68	0.1872
maniobra*presion	22	1.1200826E12	50912846667	2.23	0.0010
momento*maniobra	11	1.5514098E12	141037250164	6.19	<.0001

		Error	Número		
presion	area LSMEAN	estándar	Pr >  t	LSMEAN	
50	12082.1693	73.6476	<.0001	1	
65	11670.9170	79.1020	<.0001	2	
80	11795.5779	86.9129	<.0001	3	

i/j	1	2	3
1		0.0002	0.0120



2	0.0002	0.2890
3	0.0120	0.2890

presion	perim	Error LSMEAN	Número estándar	Pr >  t	LSMEAN
50	389.020796	1.183739	<.0001	1	
65	382.401484	1.271407	<.0001	2	
80	384.267875	1.396953	<.0001	3	

i/j	1	2	3
1		0.0002	0.0096
2	0.0002		0.3233
3	0.0096	0.3233	

presion	diam	Error LSMEAN	Número estándar	Pr >  t	LSMEAN
50	123.829837	0.376805	<.0001	1	
65	121.722162	0.404712	<.0001	2	
80	122.316245	0.444675	<.0001	3	

i/j	1	2	3
1		0.0001	0.0096
2	0.0001		0.3233
3	0.0096	0.3233	

presion	vol	Error LSMEAN	Número estándar	Pr >  t	LSMEAN
50	1003507.15	9220.89	<.0001	1	
65	952164.84	9903.78	<.0001	2	
80	968754.19	10881.74	<.0001	3	

i/j	1	2	3
1		0.0002	0.0150
2	0.0002		0.2597
3	0.0150	0.2597	

momento	presion	Error LSMEAN	Número estándar	Pr >  t	LSMEAN
---------	---------	--------------	-----------------	---------	--------



1	50	12468.2864	94.1906	<.0001	1
1	65	11979.3899	100.6682	<.0001	2
1	80	11975.7980	109.0468	<.0001	3
2	50	11696.0521	112.3949	<.0001	4
2	65	11362.4442	118.8454	<.0001	5
2	80	11615.3579	130.6603	<.0001	6

Variable dependiente: area						
i/j	1	2	3	4	5	6
1		0.0004	0.0007	<.0001	<.0001	<.0001
2	0.0004		0.9806	0.0612	<.0001	0.0282
3	0.0007	0.9806		0.0749	0.0002	0.0307
4	<.0001	0.0612	0.0749		0.0414	0.6387
5	<.0001	<.0001	0.0002	0.0414		0.1505
6	<.0001	0.0282	0.0307	0.6387	0.1505	

Error						
momento		presion	perim LSMEAN	Número estándar	Pr >  t	LSMEAN
1	50	395.149029	1.513926	<.0001	1	
1	65	387.380972	1.618042	<.0001	2	
1	80	387.024764	1.752710	<.0001	3	
2	50	382.892563	1.806525	<.0001	4	
2	65	377.421997	1.910204	<.0001	5	
2	80	381.510985	2.100105	<.0001	6	

Variable dependiente: perim						
i/j	1	2	3	4	5	6
1		0.0005	0.0005	<.0001	<.0001	<.0001
2	0.0005		0.8809	0.0651	<.0001	0.0277
3	0.0005	0.8809		0.1016	0.0002	0.0397
4	<.0001	0.0651	0.1016		0.0374	0.6170
5	<.0001	<.0001	0.0002	0.0374		0.1481
6	<.0001	0.0277	0.0397	0.6170	0.1481	

Error						
momento		presion	diam LSMEAN	Número estándar	Pr >  t	LSMEAN
1	50	125.780673	0.481910	<.0001	1	
1	65	123.307636	0.515052	<.0001	2	
1	80	123.193775	0.557919	<.0001	3	
2	50	121.879002	0.575049	<.0001	4	
2	65	120.136688	0.608052	<.0001	5	
2	80	121.438714	0.668501	<.0001	6	

Variable dependiente: diam



i/j	1	2	3	4	5	6
1		0.0005	0.0005	<.0001	<.0001	<.0001
2	0.0005		0.8804	0.0651	<.0001	0.0277
3	0.0005	0.8804		0.1018	0.0002	0.0397
4	<.0001	0.0651	0.1018		0.0373	0.6166
5	<.0001	<.0001	0.0002	0.0373		0.1480
6	<.0001	0.0277	0.0397	0.6166	0.1480	

	momento	presion	Error vol LSMEAN	Número estándar	Pr >  t	LSMEAN
1	50	1052327.89	11792.92	<.0001	1	
1	65	990510.56	12603.94	<.0001	2	
1	80	992296.40	13652.95	<.0001	3	
2	50	954686.40	14072.15	<.0001	4	
2	65	913819.12	14879.77	<.0001	5	
2	80	945211.98	16359.03	<.0001	6	

**Variable dependiente: vol**

i/j	1	2	3	4	5	6
1		0.0004	0.0009	<.0001	<.0001	<.0001
2	0.0004		0.9232	0.0587	<.0001	0.0292
3	0.0009	0.9232		0.0559	0.0001	0.0242
4	<.0001	0.0587	0.0559		0.0459	0.6597
5	<.0001	<.0001	0.0001	0.0459		0.1540
6	<.0001	0.0292	0.0242	0.6597	0.1540	

**proc sort;** by momento maniobra presion;  
**proc glm;** class momento maniobra presion; **model** area perim diam vol = momento  
 maniobra presion momento\*presion maniobra\*presion momento\*maniobra;  
**lsmeans** presion momento\*presion/p s;





### Anexo 3. Hoja de control de datos.

Fecha:

Hora (promedio) de recolección de ovarios:

Hora de inicio de aspiración:

Hora de inicio de maduración:

Aspiración:

Búsqueda:

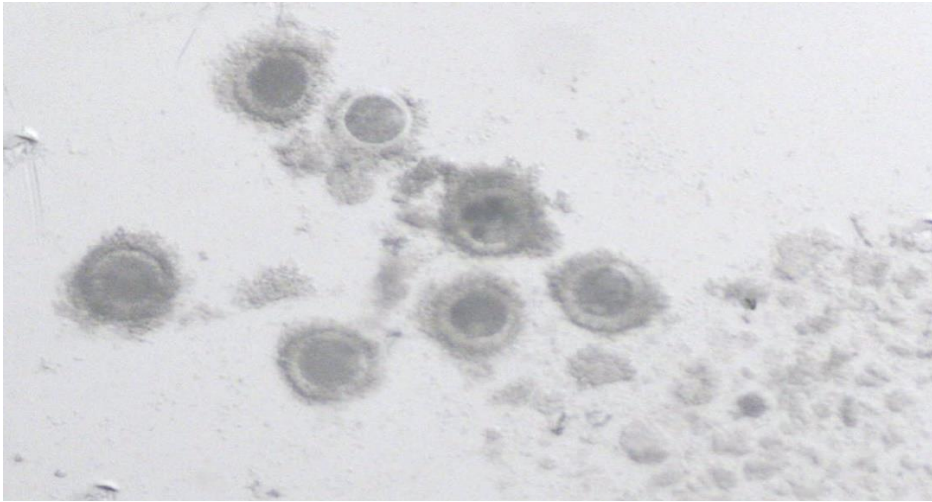
HOJA DE REGISTRO DE DATOS						
Numero de ovarios	Presiones de aspiración (mmHg)					
	50		65		80	
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
Total de folículos aspirados						
Total de ovocitos						
Número de ovocitos tipo A - B						
Ovocitos teñidos con azul Tripán (30%)						
Resultados: viable (V), no viable (NV)	V	NV	V	NV	V	NV
Número						
Total ovocitos a madurar						
Ovocitos teñidos Hoechst (30%)						
Resultados: Maduro (MII), Inmaduro (MI)	V	NV	V	NV	V	NV
Número						
Total ovocitos a fecundar						
Resultados: segmentados (S), no segmentados (NS)	S	NS	S	NS	S	NS
Número						



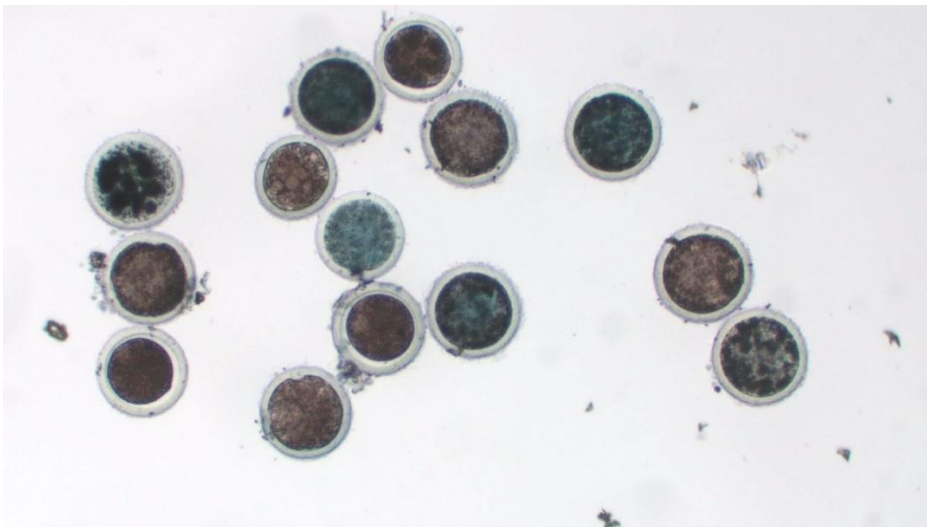
**Anexo 4. Cuadro de secuencia de presiones.**

Fecha de maniobra	PRESIONES (mmHg)		
	50	65	80
	1	2	3
	3	1	2
	2	3	1
	1	2	3
	3	1	2
	2	3	1
	1	2	3
	3	1	2
	2	3	1
	1	2	3
	3	1	2
	2	3	1

**Anexo 5. Ovocitos (tipo C) que se descartaron para la maduración.**



**Anexo 6. Ovocitos viables y no viables después de la prueba de Azul de Tripán**



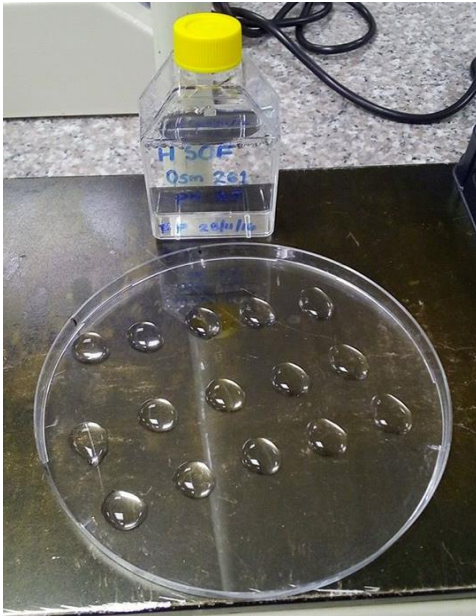
**Anexo 7. Ovario con quiste folicular.**



**Anexo 8. Recolección de ovarios del Camal de Cuenca**



**Anexo 9. Lavado de ovocitos en gotas de HSOF.**



**Anexo 10. Búsqueda de ovocitos en el estereoscopio.**

